

LAIANE LEMOS

Identificação e caracterização de alfa- e beta-amastinas de *Trypanosoma cruzi*

CURITIBA  
2016

LAIANE LEMOS

Identificação e caracterização de alfa- e beta-amastinas de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Duarte daRocha.

CURITIBA  
2016

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Lemos, Laiane

Identificação e caracterização de alfa- e beta-amastinas de *Trypanosoma cruzi*. / Laiane Lemos. – Curitiba, 2016.

89f.: il. ; 30cm.

Orientador: Wanderson Duarte da Rocha

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Proteínas. I. Título II. Rocha, Wanderson Duarte da. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

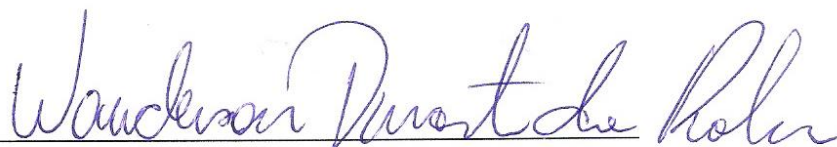
CDD (20. ed.) 574.192

## TERMO DE APROVAÇÃO

LAIANE LEMOS

Identificação e caracterização de alfa- e beta-amastinas de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha - Orientador  
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Marcelo Muller dos Santos  
Departamento de Bioquímica, UFPR



Dr.ª Gisele Fernanda Assine Picchi  
FIOCURZ – ICC-PR

Curitiba, 31 de março de 2016.

## RESUMO

A identificação de genes diferencialmente expressos durante o ciclo biológico de parasitos causadores de patologias é importante na busca por potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas e tratamentos. *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da Doença de Chagas e possui proteínas estágio-específicas que vêm sendo bastante estudadas, como a família das trans-sialidasas, as mucinas e as amastinas. Amastinas são proteínas de superfície inicialmente descritas como específicas de formas amastigotas de *T. cruzi* e *Leishmania donovani*. A partir de análises *in silico* de amastinas presentes em diferentes tripanossomatídeos, elas foram classificadas nas subfamílias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . Para *T. cruzi* (clone CL Brener), foi estimado um total de 14 cópias de genes de amastinas, dos quais duas  $\beta$ -amastinas (mais expressas e epimastigotas) e 12  $\delta$ -amastinas. Como não se sabe o papel dessas proteínas, a caracterização funcional é um caminho a ser percorrido. Neste trabalho, que está subdividido em duas partes principais, os objetivos foram a da caracterização das  $\beta$ -amastinas através de deleção por recombinação homóloga e a ampliação da identificação de amastinas em *T. cruzi*. A partir de buscas considerando fragmentos gerados durante o sequenciamento do clone CL Brener, que não foram atribuídos a cromossomos e/ou ORFs não preditas, encontramos sequências ainda não identificadas como amastinas, mas que são semelhantes às amastinas descritas anteriormente. Após análises *in silico* para presença de domínios, regiões transmembrana, conservação de sequências e organização genômica comparativamente às amastinas previamente descritas em tripanossomatídeos, propomos a presença de  $\alpha$ -amastinas no genoma de *T. cruzi*, nomeadas aqui como  $\alpha 1$ - e  $\alpha 2$ -amastinas. Estas amastinas aparecem em cópia única localizada em região cromossômica diferente das outras amastinas já descritas em *T. cruzi* e estão organizadas em sequência.  $\alpha 1$ -amastinas têm localização subcelular na superfície do parasito e  $\alpha 2$ -amastinas aparecem em regiões pontuais do citoplasma. Sobre a deleção de  $\beta$ -amastinas, foram construídos e transfectados em CL Brener cassetes para interrupção/bloqueio da expressão desses genes em seu par homólogo de cromossomos, pela recombinação homóloga desses cassetes. Após integração do primeiro cassete não foram verificadas alterações no crescimento de parasitos transfectados. O segundo cassete de deleção foi transfectado em clones mutantes heterozigotos e após algumas tentativas foi obtida uma população de parasitos estáveis e resistentes aos dois antibióticos. A integração desse segundo cassete foi verificada por PCR, mas também foi observada a presença das regiões codificadoras das  $\beta$ -amastinas intactas nessa população duplo-resistente, o que sugere que essas amastinas sejam essenciais para epimastigotas. Apesar de todo conhecimento gerado aqui, mais estudos são necessários para entender as funções dessas proteínas no parasito.

Palavras-chave: amastinas, alfa-amastinas, nocaute.

## ABSTRACT

The identification of differentially expressed genes during *T. cruzi* life cycle is relevant since they can be potential targets for the development of vaccines and treatments. *T. cruzi* is the etiological agent of Chagas disease and has stage-specific proteins that have been studied, such as the family of trans-sialidases, mucins and amastins. Amastins are surface proteins initially described as amastigotes specific genes from *T. cruzi* and *Leishmania donovani*. *In silico* analysis of amastins presented in different trypanosomatids allowed its classification in  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  subfamilies. *T. cruzi* (CL Brener clone) was estimated from a total of 14 gene copies of amastins, two of which are  $\beta$ -amastins (more expressed in epimastigotes) and 12  $\delta$ -amastins. As the role of these proteins are still unknown, the functional characterization is crucial. Here we improved amastin characterization by studying  $\beta$ -amastins through deletion by homologous recombination and by identifying new amastin members in *T. cruzi*. By screening the genomic sequences of CL Brener clone that are poorly explored, the unassigned contigs, sequences encoding new *T. cruzi* amastins were found. *In silico* analysis to identify presence of domains, transmembrane regions, conservation sequences and genomic organization corroborate the presence of  $\alpha$ -amastins in the *T. cruzi* genome, named here as  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-amastins. Both genes appear as single copy genes located in a distinct chromosome compared to the other amastins described in *T. cruzi*. The expression of GFP fusion proteins showed that  $\alpha$ 1-amastin is targeted to the parasite surface and  $\alpha$ 2-amastin is concentrated in a specific regions of the cytoplasm. In parallel, we tried to knock out the  $\beta$ -amastins, two constructs were created and transfected in CL Brener. After deletion using the first allele no changes were observed in the growth curve of transfected parasites. To delete the second allele, the cassette was transfected in heterozygous mutant clones, and after several attempts a double-resistant population of parasites was obtained. The PCR analysis showed the integration of the second cassette at the predicted locus, however intact copies of the coding sequence of both amastins were detected by PCR. These results suggest that  $\beta$ -amastins are essential for epimastigote survival. Despite all efforts described here, a lot more is needed to define amastin function.

Key words: amastin, alpha-amastins, knockout

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	15
FIGURA 2. Representação esquemática de uma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
FIGURA 3. Esquema representativo da organização genômica e expressão gênica em tripanossomatídeos.....	20
FIGURA 4. Representação esquemática de proteínas e receptores envolvidos na interação hipotética de um tripomastigota metacíclico de <i>Trypanosoma cruzi</i> com uma célula hospedeira.....	24
FIGURA 5. Esquema representativo da topologia predita das proteínas amastinas.....	25
FIGURA 6. Filogenia de genes de amastinas de diferentes espécies agrupados por máxima verossimilhança.....	27
FIGURA 7. Identificação de domínios e regiões transmembrana das prováveis proteínas amastinas codificadas pelos <i>contigs</i> Tcruzi_6279 e Tcruzi_12631.....	49
FIGURA 8. Análise filogenética de membros de diferentes subfamílias de amastinas.....	51
FIGURA 9. Predição de estrutura terciária de $\alpha$ -amastinas.....	52
FIGURA 10. Alinhamento entre amastinas de <i>T. cruzi</i> e claudinas.....	54
FIGURA 11. Alinhamento entre sequências de aminoácidos de diferentes isoformas de amastinas e claudinas e Weblogo de amastinas de <i>T. cruzi</i> .....	56
FIGURA 12. Esquema representativo dos <i>contigs</i> que codificam $\alpha$ -amastinas de <i>T. cruzi</i> (clone CL Brener) e montagem de contig quimérico.....	57
FIGURA 13. Mapa de restrição de um <i>contig</i> quimérico de <i>Trypanosoma cruzi</i> e ensaio de polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RLFP) de DNA genômico de clones e cepas selvagens de <i>T. cruzi</i> para verificação do arranjo genômico de $\alpha$ 1-amastina.....	58
FIGURA 14. Esquema teórico de organização genômica de $\alpha$ -amastinas em <i>Trypanosoma cruzi</i> , amplificações e digestões de DNA genômico de clones e cepas selvagens do parasito para verificação desta organização.....	59
FIGURA 15. Localização genômica de $\alpha$ 1-amastina em diferentes clones e cepas de <i>T. cruzi</i> .....	60
FIGURA 16. Desenho esquemático de vetores pTREX_Ama $\alpha$ 1GFP e pTREX_Ama $\alpha$ 2GFP e diagnóstico de sua construção.....	62

FIGURA 17. Localização de $\alpha$ -amastinas fusionadas a GFP em <i>T. cruzi</i> .....	64
FIGURA 18. <i>Western blot</i> de extrato total de parasitos epimastigotas cepa G e CL Brener do tipo selvagem e transfectados.....	65
FIGURA 19. Avaliação do efeito da expressão de $\alpha$ -amastinas no crescimento de epimastigotas cepa G transfectadas.....	66
FIGURA 20. Esquema representativo da estratégia para deleção por recombinação homóloga das $\beta$ -amastinas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e confirmação da construção dos vetores e preparação do cassete.....	68
FIGURA 21. Diagnóstico de entrada e integração do cassete UP32NEODN32 em CL Brener.....	69
FIGURA 22. Avaliação do efeito da deleção de $\beta$ -amastinas em um dos alelos de CL Brener.....	70
FIGURA 23. Diagnóstico de entrada e integração do cassete UP32HIGRODN32 em CL Brener.....	71
FIGURA 24. Amplificação de regiões codificadoras de $\beta$ -amastinas em CL Brener.....	72
FIGURA 25. Avaliação do efeito da deleção de $\beta$ -amastinas em parasitos transfectados duplo-resistentes em CL Brener.....	74



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Meios de cultivo utilizados e suas composições.....	31
TABELA 2: Reagentes, corantes e tampões utilizados e suas composições.....	32
TABELA 3: Nomes e sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho.....	34
TABELA 4: Vetores plasmidiais utilizados e principais características.....	34
TABELA 5: Informações gerais sobre genomas consultados neste trabalho.....	35
TABELA 6: <i>Contigs</i> que codificam novas amastinas de <i>T. cruzi</i> (clone CL Brener) identificadas pelas análises de tBlastn depositados no TriTrypDB.....	48
TABELA 7: Informações sobre as sequências de aminoácidos encontradas nos contigs Tcruzi_6279 e Tcruzi_12631.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$	–	$\alpha[^{32}\text{P}]$ 5' trifosfato de 2' desoxicitidina
$\alpha\text{-GFP}$	–	Anticorpo anti-Proteína Verde Fluorescente
$\alpha\text{-Alfa}$ Tubulina	–	Anticorpo anti-Alfa Tubulina
3' UTR	–	Região 3' não traduzida
5' UTR	–	Região 5' não traduzida
Amp <sup>r</sup>	–	Resistencia a Ampicilina
BSA	–	Albumina de soro bovino (do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i> )
cDNA	–	DNA complementar
Chr	–	Cromossomo (do inglês, <i>Chromosome</i> )
Da	–	Dalton
DAPI	–	4',6-diamidino-2-Fenilindol
DGF-1	–	Família de Genes Dispersos (do inglês, <i>Dispersed Gene Family</i> )
DNA	–	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	–	Deoxinucleotídeo trifosfato
DO	–	Densidade Ótica
DTU	–	Unidade de Tipagem Discreta (do inglês, <i>Discrete Typing Unit</i> )
EDTA	–	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	–	Isotiocianato de fluoresceína
G418	–	Geneticina418 (análogo a Neomicina)
GFP	–	Proteína verde fluorescente (do inglês, <i>Green Fluorescent Protein</i> )
gGAPDH	–	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal
gp63	–	Glicoproteína de 63 kDa
gp85	–	Glicoproteína de 85 kDa
GPI	–	Glicosilfosfatidilinositol
Higro	–	Higromicina
HX1	–	Região 5'UTR da proteína ribossômico TcP2 $\beta$
kb	–	Kilobases
kDNA	–	DNA do cinetoplasto
LA	–	Meio de cultivo Luria-Bertani ágar
Lb	–	<i>Leishmania brasiliensis</i>
LB	–	Meio de cultivo Luria-Bertani
LIT	–	Meio de cultivo com Infuso de fígado e triptose (do inglês, <i>Liver Infusion Tryptose</i> )
Lm	–	<i>Leishmania major</i>
mRNA	–	RNA mensageiro
MASP	–	Proteínas de Superfície Associadas às Mucinas (do inglês, <i>Mucin-associated surface protein</i> )
Mb	–	Mega bases
Mpb	–	Mega pares de base

NCBI	–	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês, <i>National Center for Biotechnological Information</i> )
Neo	–	Neomicina
nt	–	Nucleotídeo
ORF	–	Fase aberta de leitura (do inglês, <i>Open Read Frame</i> )
Pb	–	Pares de base
PCR	–	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PEPCK	–	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PFGE	–	Gel de Eletroforese em Campo Pulsado (do inglês, <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> )
pH	–	Potencial hidrogeniônico
pI	–	Ponto isoelétrico
Poli(A)	–	Poliadenina
Poli(Y)	–	Polipirimidina
PTU	–	Unidade de Transcrição Policistrônica (do inglês, <i>Polycistronic Transcription Unit</i> )
RFLP	–	Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (do inglês, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
RNA	–	Ácido Ribonucleico
RNAi	–	RNA de interferência
RNA pol I	–	RNA Polimerase I
RNA pol II	–	RNA Polimerase II
RNAse	–	Ribonuclease
rpm	–	Rotações por minuto
RT-PCR	–	PCR com transcriptase reversa (do inglês, <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> )
rRNA	–	RNA ribossômico
SDS	–	Dodecil sulfato de sódio
SFB	–	Soro fetal bovino
SSC	–	Tampão citrato de sódio/ cloreto de sódio
TAU	–	Meio de cultivo de urina artificial de triatomíneo (do inglês, <i>Triatomine Artificial Urine</i> )
Tb	–	<i>Trypanosoma brucei</i>
TBE	–	Tris Borato EDTA
Tc	–	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TCT	–	Tripomastigota derivadas de Tecido Celular
TS	–	Transialidases
TSA-1	–	Antígeno de Superfície de Tripomastigota (do inglês, <i>trypomastigote surface antigen 1</i> )
UTR	–	Região Não Traduzida (do inglês, <i>untranslated region</i> )
WHO	–	Organização Mundial da Saúde (do inglês, <i>World Health Organization</i> )
WT	–	Tipo selvagem (do inglês, <i>Wild Type</i> )

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 DOENÇA DE CHAGAS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>.....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Organização celular .....	17
2.2.2 Controle da expressão gênica.....	19
<b>2.3 ALGUMAS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE E A INTERAÇÃO PARASITO- HOSPEDEIRO.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 AMASTINAS .....</b>	<b>25</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>29</b>
<b>4 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>30</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5.1 MEIOS DE CULTIVO E REAGENTES .....</b>	<b>31</b>
<b>5.2 CULTIVO DE ORGANISMOS.....</b>	<b>32</b>
5.2.1 Bactérias .....	32
5.2.2 Parasitos .....	32
<b>5.3 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....</b>	<b>33</b>
<b>5.4 VETORES .....</b>	<b>34</b>
<b>5.5 ANÁLISES <i>in silico</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>5.6 AMPLIFICAÇÃO DE DNA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....</b>	<b>36</b>
<b>5.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE .....</b>	<b>37</b>
<b>5.8 RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DE DNA .....</b>	<b>37</b>
<b>5.9 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS .....</b>	<b>37</b>
<b>5.10 REAÇÕES DE LIGAÇÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>5.11 PREPARO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES .....</b>	<b>38</b>
<b>5.12 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO E SELEÇÃO DE CLONES POSITIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>5.13 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA POR LISE ALCALINA .....</b>	<b>39</b>

5.14 TRANSFEÇÃO E SELEÇÃO EM <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	40
5.15 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	40
5.16 CLONAGEM DE PARASITOS TRANSFECTADOS.....	41
5.17 OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTEICO TOTAL DE EPIMASTIGOTAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	42
5.18 SDS-PAGE DO EXTRATO PROTEICO TOTAL DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	42
5.18.1 Coloração com azul de Coomassie.....	42
5.18.2 Coloração com prata .....	42
5.19 WESTERN BLOT DE EXTRATO PROTEICO TOTAL DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	43
5.20 ENSAIO DE POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DO FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP) E SOUTHERN BLOT .....	43
5.21 GEL DE ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE) .....	44
5.22 MARCAÇÃO DE SONDAS RADIOATIVAS E HIBRIDIZAÇÃO.....	45
5.23 CITOMETRIA DE FLUXO .....	45
5.24 MICROSCOPIA CONFOCAL .....	46
5.25 CURVA DE CRESCIMENTO .....	46
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
6.1 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISES <i>in silico</i> DA NOVA CLASSE DE AMASTINAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	47
6.2 ARRANJO GENÔMICO DE $\alpha$ -AMASTINAS EM <i>T. cruzi</i> .....	56
6.3 DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE $\alpha$ -AMASTINAS EM <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	60
6.4 CARACTERIZAÇÃO DE $\beta$ -AMASTINAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> POR MEIO DE SUA DELEÇÃO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA .....	66
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	75
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXO 1.....	86

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, é uma doença tropical negligenciada que acomete cerca de 7 milhões de pessoas do mundo e atinge também mamíferos silvestres e domésticos. Como os medicamentos disponíveis não são eficazes para todas as linhagens de *T. cruzi* que podem causar a doença, a busca por alvos para desenvolvimento de vacinas e tratamentos é uma necessidade. Além disso, o estudo desse peculiar parasito pode fornecer importantes informações para o entendimento do curso da doença e dos mecanismos que o parasito utiliza para se comunicar e infectar organismos hospedeiros.

Nesse sentido, proteínas de expressão diferencial no parasito tendem a ser bastante exploradas. Como é o caso das amastinas, inicialmente descritas como específicas de formas amastigotas de *T. cruzi* e *Leishmania donovani*. Estas proteínas apresentam quatro regiões transmembrana e, embora divergentes em parte de suas sequências, conservam alguns resíduos de aminoácidos que podem ser importantes para desempenho de sua função e que são designados como “assinatura das amastinas”. Amastinas foram encontradas em outros tripanossomatídeos e são classificadas nas subfamílias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , sendo que em *T. cruzi* (clone CL Brener), foi estimado um total de 14 cópias de genes de amastinas, duas  $\beta$ -amastinas e 12  $\delta$ -amastinas. (JACKSON, 2010; KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

Para ampliar os conhecimentos sobre essas proteínas, nesse trabalho propomos a busca e identificação de novos membros da família das amastinas em *T. cruzi* (clone CL Brener), a partir de pesquisas mais abrangentes nos dados de sequenciamento disponíveis para esse clone (EL-SAYED *et al.*, 2005a).

Outra proposta do trabalho é a continuidade da caracterização das  $\beta$ -amastinas, a partir de deleção por recombinação homóloga desses genes, que parecem estar em cópia única no genoma e são mais expressas em formas epimastigotas (WEATHERLY *et al.*, 2009; JACKSON, 2010; KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DOENÇA DE CHAGAS

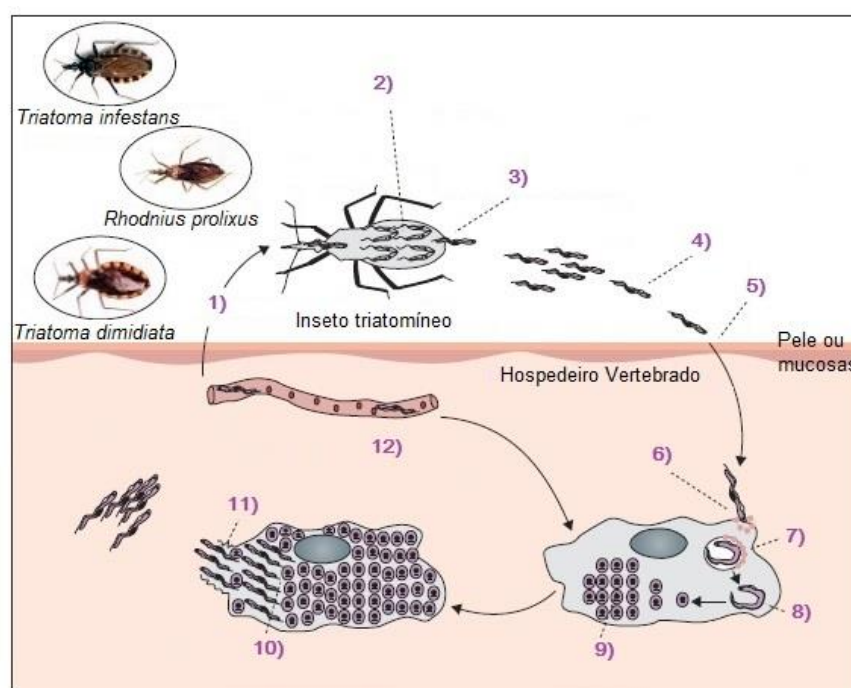
*Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas (CHAGAS, 1909), pertence à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, que reúne outros protozoários parasitos, como *Trypanosoma brucei* e *Leishmania* spp., causadores de Doença do sono e Leishmaniose, respectivamente. Juntas, estas são consideradas as três mais importantes doenças tropicais negligenciadas e afetam cerca de 22 milhões de pessoas no mundo. Além do homem, mamíferos silvestres e domésticos têm sido encontrados infectados por *T. cruzi* (SCHMUNIS, 2007; COURA E VIÑAS, 2010)

A Doença de Chagas (ou Tripanossomíase Americana) é endêmica em 21 países da América Latina, mas devido ao fluxo migratório, há regiões da Europa, oeste do Pacífico e América do Norte onde podem ser encontrados indivíduos infectados (PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2012; WHO, 2016). Estima-se que 7 milhões de pessoas estão contaminadas em todo o mundo e mais de 25 milhões correm o risco de contrair a doença (WHO, 2016). Calcula-se que há cerca de 56.000 novos casos anuais e 12.000 mortes em todas as regiões endêmicas (Organização Panamericana de Saúde, 2015). No Brasil, estima-se que entre 2 a 3 milhões de pessoas estão infectadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Uma das mais estudadas formas de transmissão da doença é a vetorial (na qual o ciclo biológico do parasito se completa), através de excretas de insetos da ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, sendo *Triatoma infestans*, *T. dimidiata* e *Rhodnius prolixus* consideradas as espécies mais importantes (RASSI *et al.*, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

No momento do repasto sanguíneo em mamíferos contaminados, os insetos ingerem formas tripomastigotas sanguíneas, que no intestino anterior do inseto se diferenciam em esferomastigotas. Passando pelo intestino médio, estes parasitos se transformam em epimastigotas (formas replicativas) e estas formas se aderem às células epiteliais do intestino posterior e à cutícula cerosa do reto, onde ocorre o processo de metaciclogênese, no qual epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (formas infectivas aos mamíferos e não-replicativas). Tripomastigotas metacíclicos se desprendem do intestino e são excretadas junto à urina e fezes do inseto enquanto ele se alimenta, e o contato destas excretas com a pele do indivíduo picado pode levar à infecção. Tripomastigotas metacíclicos interagem com diferentes tipos de células hospedeiras (como macrófagos, células musculares e epiteliais), podendo invadir e ser internalizados por estas células. O momento da invasão coincide com a formação de um compartimento endocítico com membrana

revestida de lisossomos, o vacúolo parasitóforo. Este vacúolo apresenta em seu interior ácidos líticos que são potencialmente prejudiciais para os parasitos, o que obriga sua saída e posterior diferenciação em formas amastigotas. Estas formas se multiplicam por fissão binária e iniciam uma nova diferenciação, agora em tripomastigotas, antes da célula se romper por excesso de parasitos. Como a lise da célula pode ocorrer antes da total diferenciação, amastigotas e tripomastigotas sanguíneas são liberadas. Tais parasitos podem invadir células adjacentes ou entrar na corrente sanguínea. A forma tripomastigota pode ser ingerida pelo inseto, dando continuidade ao ciclo (FIGURA 1) (BRENER, 1973; TYLER, 2001; ÁVILA *et al.*, 2003; RASSI *et al.*, 2010).



**FIGURA 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***

**FONTE:** Adaptado de RASSI *et al.*, 2010.

**NOTA:** Durante o repasto sanguíneo (1), insetos triatomíneos ingerem formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi*, que passam pelo intestino anterior do inseto e, no intestino médio, se diferenciam em epimastigotas (2) que se multiplicam por fissão binária migram para o intestino posterior do inseto, onde se aderem e passam pelo processo de metaciclogênese, no qual se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (3), tais formas infectivas são liberadas pelo hospedeiro invertebrado junto com fezes e urina, que normalmente são excretados enquanto o inseto se alimenta de sangue (4), tripomastigotas metacíclicas estando próximas ao local da picada podem entrar em contato com o hospedeiro vertebrado através da lesão causada pelo inseto (sendo também possível sua entrada através de mucosas intactas, como a oral) (5); parasitos invadem diferentes tipos celulares do hospedeiro mamífero e são internalizados por vacúolos parasitóforos (6) e (7); tripomastigotas saem do vacúolo e se diferenciam em amastigotas (8), ocorre sua replicação por fissão binária (9) e transformação em tripomastigotas sanguíneas (10); após lise celular há espalhamento da infecção (11) e tripomastigotas sanguíneos podem infectar outras células ou percorrer a corrente sanguínea (12), onde podem ser infectar novos insetos triatomíneos caso haja uma nova picada.



Outros modos de infecção são: via oral (ingestão de alimentos contaminados por insetos infectos ou pelas fezes destes); transfusões sanguíneas ou transplante de órgãos; via congênita e acidentes laboratoriais (seja na manipulação do inseto infectado ou do próprio parasito). Em áreas não endêmicas a infecção ocorre principalmente através de transfusões sanguíneas e pela transmissão vertical (RASSI *et al.*, 2010; NUNES *et al.*, 2013; FIOCRUZ, 2016).

Durante o curso clínico da Doença de Chagas pode ser observada inicialmente a fase aguda, normalmente assintomática e inaparente, sendo que, quando aparente, os sinais clínicos aparecem entre 5 a 14 dias após transmissão pelo inseto vetor e 30 a 40 dias após infecção por transfusão sanguínea. São exemplos de sintomas relatados: febre de intensidade variável, mal-estar, inflamação de gânglios linfáticos e disfunção cardíaca. O chagoma, reação inflamatória que gera edema no local de entrada do parasito, pode ocorrer e persistir por até oito semanas. Pode ocorrer ainda um edema inflamatório unilateral de pálpebra (sinal de Romana), quando a contaminação acontece na mucosa ocular. A mortalidade na fase aguda pode chegar a até 10% dos indivíduos sintomáticos, como resultado de miocardite ou meningoencefalite severa (LARANJA *et al.*, 1956 RASSI *et al.*, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

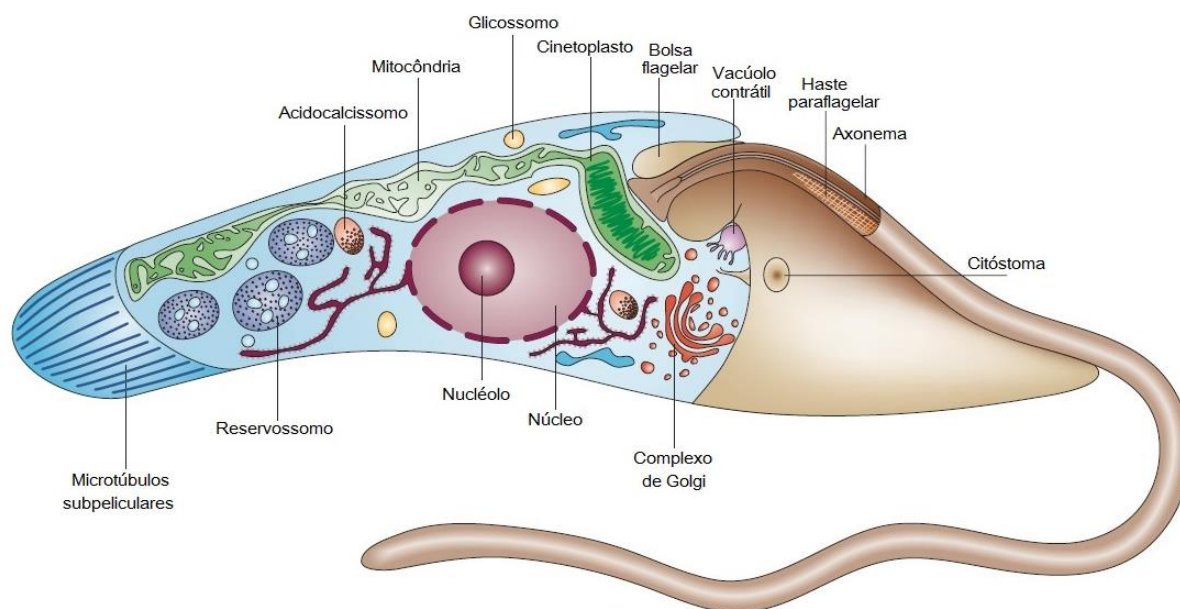
Após a fase aguda, cerca de 70% dos indivíduos infectados passam para uma fase crônica indeterminada, sem manifestações clínicas da doença, enquanto até 30% dos pacientes evolui para fase crônica determinada, apresentando quadros clínicos que incluem distúrbios cardíacos (megacárdio) e digestivos (megaesôfago e megacólon) (RASSI *et al.*, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Como ainda não há vacina contra Doença de Chagas, o controle do inseto vetor, a triagem das amostras de sangue antes de transfusões e transplantes e o tratamento dos pacientes infectados são as ferramentas atualmente disponíveis para controle desta doença. Porém, a relativa toxicidade das drogas Benzonidazol e Nifurtimox (as únicas indicadas para o tratamento em humanos) em pacientes adultos e a sensibilidade variável a essas drogas dentre as diferentes cepas de *T. cruzi* refletem a necessidade de contínuo estudo e desenvolvimento de novas terapias (BERMUDEZ *et al.*, 2016).

## 2.2 *Trypanosoma cruzi*

### 2.2.1 Organização celular

*Trypanosoma cruzi*, assim como os demais organismos que pertencem à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, é um protozoário unicelular que possui hábito de vida parasitário e estruturas que possibilitam sua adaptação a diferentes ambientes ao longo de seu ciclo de vida. *T. cruzi* possui organelas em comum com os demais eucariotos, mas também algumas que são exclusivas de protozoários, as quais serão exploradas a seguir. Na figura 2 há um desenho representativo de uma forma epimastigota de *T. cruzi*.



**FIGURA 2. Representação esquemática de uma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.**

**FONTE:** Adaptado de DOCAMPO *et al*, 2005.

**NOTA:** Esquema com cores ilustrativas evidenciando as principais organelas e estruturas de *T. cruzi*, na região anterior está localizado o flagelo e na região posterior, os microtúbulos subpeliculares estão indicados.

A membrana plasmática de *T. cruzi* pode ser subdividida em quatro regiões principais: corpo celular, citóstoma, flagelo e bolsa flagelar. A maioria das organelas está localizada no corpo celular e o flagelo, responsável pela motilidade e adesão do parasito a diferentes superfícies, surge de uma invaginação endocítica, a bolsa flagelar. Logo abaixo da membrana plasmática estão localizados os microtúbulos subpeliculares, que formam o citoesqueleto e proporcionam resistência a choques mecânicos, porém, na região da bolsa flagelar não são encontrados esses microtúbulos, o que permite que haja exocitose e endocitose mediada por clatrina. Também ocorre aquisição de nutrientes no citóstoma, uma

invaginação que se comunica fisicamente com a bolsa flagelar e pode alcançar o núcleo (SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1984; OKUDA *et al.*, 1999; DE SOUZA, 2002; DE SOUZA *et al.*, 2009).

Os tripanossomatídeos apresentam uma mitocôndria única altamente ramificada que pode ocupar um espaço varável no corpo celular, dependendo do ambiente e condições nutricionais. Na matriz mitocondrial existe uma estrutura, o cinetoplasto, que concentra um tipo especial de DNA, o kDNA (DNA do cinetoplasto). O cinetoplasto sempre está localizado próximo e conectado ao corpo basal, definindo a origem do flagelo. A disposição do cinetoplasto em relação ao núcleo varia ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi* (permitindo a identificação da forma biológica): em formas replicativas (epimastigota e amastigota), moléculas de kDNA estão bem empacotadas, formando um disco côncavo orientado paralelamente ao eixo longitudinal do parasito, tal disco encontra-se anterior ao núcleo; em formas tripomastigotas o cinetoplasto está arredondado e posterior ao núcleo (MORRIS *et al.*, 2001; DE SOUZA, 2002; DE SOUZA *et al.*, 2009).

O kDNA é formado por dois tipos de moléculas circulares, os maxicírculos e minicírculos, que são concatenados para formar uma estrutura única. Maxicírculos são similares em estrutura e função ao DNA mitocondrial de outros eucariotos, codificam rRNAs e subunidades da cadeia respiratória; minicírculos codificam RNAs guias que estão envolvidos em processos de edição de RNA (STURM *et al.*, 1990; ROBINSON *et al.*, 1991; DE SOUZA *et al.*, 2009).

Os glicosossomos são organelas esféricas similares a peroxissomos, onde ocorrem, além da degradação de peróxido de hidrogênio,  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e demais atividades de peroxissomos, a maior parte da via glicolítica (que em outros eucariotos ocorre no citosol) (DE SOUZA *et al.*, 2009). Os reservossomos são organelas endocíticas descritas como exclusivas de formas epimastigotas, tem como funções armazenar macromoléculas endocitadas e concentrar hidrolases lisossomais, e são considerados sítios de degradação e regulação proteica (DE SOUZA *et al.*, 2009).

Acidocalcissomos são organelas de conteúdo ácido, com alta concentração de fósforo (disponível como pirofosfato e polifosfato), sódio, cálcio e outros cátions; são capazes de realizar transporte e armazenamento desses cátions, estão envolvidos no controle do pH e da osmorregulação (DOCAMPO *et al.*, 2005; DE SOUZA *et al.*, 2009). O vacúolo contrátil, formado por vários túbulos conectados a um vacúolo central próximo à bolsa flagelar, auxilia a resistir às mudanças de osmolaridade, armazenando ou expelindo excesso de água. Foram encontradas aquaporinas tanto em acidocalcissomos quanto no vacúolo contrátil, o que reforça a ideia de envolvimento destas organelas na osmorregulação. O vacúolo contrátil também participa na regulação da homeostase de cálcio (DE SOUZA *et al.*, 2009; DOCAMPO *et al.*, 2013).

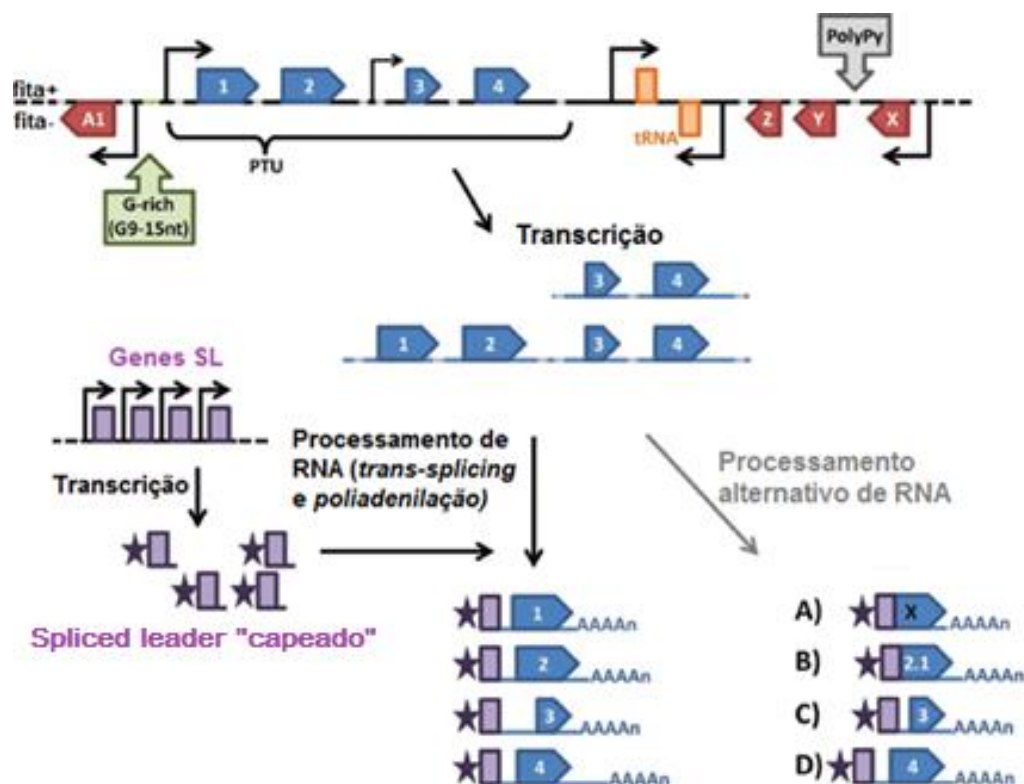
### 2.2.2 Controle da expressão gênica

Para possibilitar as modificações que ocorrem ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*, a expressão de determinadas proteínas e sinalização para ativação de organelas, é esperado que esse organismo apresente controles finos de expressão gênica. Neste ponto, *T. cruzi* e demais pertencentes à ordem dos Kinetoplastídeos apresentam algumas peculiaridades em sua biologia molecular como transcrição policistrônica, processamento de pré-mRNA por *trans-splicing*, ausência de sequências promotoras canônicas para RNA polimerase II (com exceção do gene que codifica para o *spliced leader* – SL) e RNA polimerase I transcrevendo alguns mRNA e realizando a edição de RNA de alguns genes (SOLARI, 1980; CLAYTON, 2002).

O genoma dos tripanossomatídeos é organizado em clusters (grupos, unidades) policistrônicos, que podem conter dezenas a centenas de genes codificadores de proteínas, porém, os conjuntos de genes codificam proteínas que não tem, necessariamente, funções relacionadas entre si, como ocorre nos operons de procariotos e nemátodos. Após a transcrição polistrônica, os transcritos são individualizados passando, simultaneamente, por *trans-splicing* e poliadenilação, sendo *trans-splicing* o processo no qual é adicionado um mini éxon de 39 nucleotídeos, o *spliced leader* (SL), na extremidade 5' do transcrito e poliadenilação a adição de uma cauda poli(A) na extremidade 3'. Esses processamentos são guiados por uma sequência de polipirimidina presente em cada região intergênica e geram RNAs monocistrônicos maduros. Pode ainda ocorrer processamento alternativo dos transcritos policistrônicos, gerando diferentes produtos (FIGURA 3) (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010; KOLEV *et al.*, 2010; NILSSON *et al.*, 2010; SIEGEL *et al.*, 2010 ARAÚJO *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

A organização genômica em unidades policistrônicas nos tripanossomatídeos foi verificada por diversos grupos de pesquisa que, analisando dados de sequenciamento, também mostraram que há sintenia, conservação na organização de regiões cromossômicas entre os três organismos: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi* (que quando analisados juntos são denominados TriTryps) (MYLER *et al.*, 1999; GHEDIN *et al.*, 2004; EL-SAYED *et al.*, 2005a, 2005b; IVENS *et al.*, 2005).

A sintenia ocorre, sobretudo, em regiões que contêm genes de expressão constitutiva (genes *housekeeping*), mas é interrompida em regiões de famílias multigênicas que codificam proteínas de superfície e também em regiões onde são encontrados retroelementos e RNAs estruturais (GHEDIN *et al.*, 2004; EL-SAYED *et al.*, 2005a, 2005b).



**FIGURA 3. Esquema representativo da organização genômica e expressão gênica em tripanossomatídeos.**

**FONTE:** Adaptado de TEIXEIRA *et al.*, 2012.

**NOTA:** Longas unidades de genes (caixas-setas) não relacionados aparecem organizados em unidades de transcrição policistrônica (PTUs). Tais unidades são separadas por regiões de mudança na fita transcrita, que podem ser convergentes ou divergentes. Os sítios de início de transcrição de RNA polimerase II (TSS) são normalmente encontrados a montante do primeiro gene da unidade policistrônica (podendo também estar localizados em regiões internas). Os pré mRNAs policistrônicos passam por *trans-splicing* (recebem *spliced leader* capeado) acoplado a poliadenilação e são individualizados. Os mRNAs maduros são exportados para o citoplasma onde tem sua tradução e estabilidade reguladas por elementos *cis*-atuantes presentes em suas regiões não traduzidas (UTRs). Os pré mRNAs policistrônicos podem passar por processamento alternativo, podendo gerar alterações na leitura do códon de início e possível bloqueio da tradução (A) ou resultando na geração de proteínas diferentes (B). Processamento alternativo e poliadenilação podem ainda resultar em inclusão ou exclusão de elementos regulatórios presentes nas regiões 5' UTR (C) ou 3' UTR (D), modificando a taxa de expressão de um determinado gene.

A verificação de sintenia entre tripanossomatídeos, como mencionado anteriormente, foi possível pela análise de dados de sequenciamento destes organismos. No caso de *T. cruzi*, as comparações foram feitas com dados de genoma de um clone isolado da cepa CL, denominado CL Brener (obtido a partir de clonagem de tripomastigotas encontrados em camundongos contaminados), escolhido como referência por ser considerado estável, de fácil cultivo e representativo para outras cepas circulantes (ZINGALES *et al.*, 1997; EL-SAYED *et al.*, 2005a).

Após a publicação do sequenciamento do genoma do clone CL Brener, foram realizadas montagens virtuais de cromossomos, estimou-se o número de 41 cromossomos, em tamanhos que variam de 78 kb a 2,3 Mb. Porém, devido ao fato de CL Brener ser um

clone híbrido proveniente de duas linhagens distintas foram identificados dois haplótipos (denominados *Esmeraldo-like* e *Non-Esmeraldo-like*). Como CL Brener possui cerca de 50% de seu conteúdo genômico composto por sequências repetitivas, como famílias multigênicas que codificam para proteínas de superfície, retrotransposons e repetições na região subtelomérica, várias sequências não foram atribuídas a cromossomos (EL-SAYED *et al.*, 2005a; WEATHERLY *et al.*, 2009).

Como é observada grande variabilidade entre as distintas linhagens de *T. cruzi*, (e mesmo no clone CL Brener), é importante realizar sequenciamentos e análises procurando a base para tais diferenças biológicas, bioquímicas e na resposta aos quimioterápicos. Utilizando diferentes análises, ao longo do tempo foram sugeridas classificações, como ocorreu durante o simpósio realizado em comemoração ao centenário da descoberta da Doença e Chagas, quando foi sugerida uma classificação de *T. cruzi* em seis grupos distintos, os DTUs (Discrete Typing Unit), sendo DTU um conjunto de isolados geneticamente semelhantes que pode ser identificado por marcadores moleculares ou imunológicos comuns. São referências para cada DTU as seguintes cepas e clones (cl): Sylvio X10/1 (cl1) (Tcl), Esmeraldo cl3 (TclI), M5631 cl5 (TclII), Can III cl1 (TclIV), Sc43 cl1 (TcV) e CL Brener (TcVI). Tcl possui cepas relacionadas ao ciclo silvestre de transmissão da doença enquanto as demais são associadas ciclo doméstico. Tcl e TclI correspondem aos grupos definidos em um encontro que ocorreu em 1999 e as DTUs III-VI correspondem a organismos híbridos, originados após diferentes eventos de trocas genéticas (TIBAYRENC, 1998; Anônimo, 1999; ZINGALES *et al.*, 2009, 2011).

Como comentado anteriormente, durante as análises do clone CL Brener foi verificado que seu conteúdo gênico é híbrido, e graças às comparações de contigs de CL Brener com leituras de sequenciamento de uma cepa TclI (Esmeraldo) foi possível realizar a diferenciação dos dois haplótipos (*Esmeraldo-like* e *Non-Esmeraldo-like*) e definir que CL Brener é um híbrido proveniente de ancestrais que pertencem às DTUs TclI e TclII (EL-SAYED *et al.*, 2005a).

Outros clones também tiveram seu DNA sequenciado, como o clone Sylvio X10/1 (isolado de caso humano). Foram realizadas comparações entre o conteúdo genômico dos clones CL Brener e Sylvio X10/1, com tamanhos totais estimados em aproximadamente 55 Mb para o genoma haploide de CL Brener e cerca de 44 Mb para Sylvio X10/1, e a mais significativa variação encontrada está entre os tamanhos das famílias multigênicas que codificam para proteínas de superfície nestes clones (POSTAM *et al.*, 1983; FRANZÉN *et al.*, 2011). Dm28c, outro clone bastante utilizado em estudos e classificado como Tcl teve seu DNA sequenciado, e, como esperado, foi verificada alta similaridade com o conteúdo gênico de Sylvio X10/1 (98.71% de identidade de nucleotídeos) (CONTRERAS *et al.*, 1988; GRISARD *et al.*, 2014).

Com relação às famílias multigênicas de *T. cruzi*, é possível verificar que houve expansão destes genes, quando comparado com outros membros de TriTryps, sendo alguns deles exclusivos desse parasito, localizados em regiões do genoma onde há interrupção de sintenia (EL-SAYED *et al.*, 2005a). As famílias multigênicas mais representativas são as que codificam para proteínas de superfície como trans-sialidases, proteínas de superfície associadas à mucina (MASP), mucinas e glicoproteína gp63, que juntas correspondem a cerca de 17% do total de genes codificadores de proteínas neste parasito (EL-SAYED *et al.*, 2005b; BARTHOLOMEU *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

## 2.3 ALGUMAS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE E A INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

As proteínas de superfície, principalmente as de expressão estágio específica, despertam o interesse para diversos estudos, pois elas medeiam a primeira interação com os hospedeiros, e a geração de resposta contra estas proteínas pode revelar novos alvos para o desenvolvimento de métodos para controle biológico, vacinas e terapias. Do ponto de vista terapêutico, a inibição da função de tais proteínas de *T. cruzi* pode diminuir sua interação com as células hospedeiras, desfavorecendo sua multiplicação no organismo infectado ou mesmo levar parasitos a morte, mostrando que elas também poderiam ser utilizadas no desenvolvimento de novos tratamentos. Contudo, muitas das proteínas de superfície fazem parte de famílias multigênicas, o que dificulta seu estudo de função com as ferramentas de manipulação gênica disponíveis para pesquisa em *T. cruzi*.

São exemplos de famílias multigênicas de proteínas de superfície com expressão diferencial ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*: a superfamília de gp85/transialidase (TS) (CROSS E TAKLE, 1993; SCHENKMAN *et al.*, 1994); mucinas (ACOSTA-SERRANO *et al.*, 2001; BUSCAGLIA *et al.*, 2006); MASP (proteínas de superfície associadas a mucinas) (ATWOOD *et al.*, 2005; EL-SAYED *et al.*, 2005b; BARTHOLOMEU *et al.*, 2009); gp63 (glicoproteína 63 kDa) (CUEVAS *et al.*, 2003; KULKARNI *et al.*, 2009); DGF-1 (*dispersed gene family-1*) (KAWASHITA *et al.*, 2009) e amastinas (TEIXEIRA *et al.*, 1994). Essas proteínas, sendo de expressão diferencial ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*, podem ser essenciais para o sucesso da infecção, logo constituem possíveis candidatos para o desenvolvimento de terapias e vacinas.

A superfamília das gp85/transialidases compreende as proteínas gp85, gp82, TSA-1 e transialidases, sendo estas responsáveis pela retirada de ácido siálico do hospedeiro e sua transferência ao parasito, já que *T. cruzi* (assim como os outros membros do gênero Trypanosoma) é incapaz de sintetizá-lo (CROSS E TAKLE, 1993; SCHENKMAN *et al.*, 1994;

FREITAS *et al.*, 2011). Tc85 forma uma população de proteínas com âncora GPI (glicosilfosfatidilinositol) de massas moleculares similares e diferentes pontos isoelétricos, essa população de proteínas é capaz de se ligar a diferentes receptores moleculares das células hospedeiras (como citoqueratina) e componentes da matriz extracelular (como fibronectina e laminina) (ALBUIN *et al.*, 1989; GIORDANO *et al.*, 1999; MAGDESIAN *et al.*, 2001; ALVES *et al.*, 2008). Dois grupos de glicoproteínas, gp82 e gp35/50 também estão envolvidas na invasão da célula hospedeira e são expressas na superfície de tripomastigotas metacíclicos, enquanto gp82 é capaz de ativar sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ , gp35/50 é resistente a digestão por proteases, o que parece auxiliar a proteção de tripomastigotas metacíclicos da destruição durante a infecção por via oral (RUIZ *et al.*, 1998; YOSHIDA, 2009; BARRIAS *et al.*, 2013). As mucinas são as principais aceptoras do ácido siálico, que cria uma carga negativa na membrana externa do parasito, promovendo reconhecimento, invasão celular e proteção de tripomastigotas sanguíneas (ACOSTA-SERRANO *et al.*, 2001; BUSCAGLIA *et al.*, 2006). Além disso, mucinas de *T. cruzi* (TcMUC) derivadas de culturas de tripomastigotas metacíclicos ligam-se a diferentes tipos celulares de mamíferos e anticorpos que poderiam inibir a invasão celular do hospedeiro (VILLALTA *et al.*, 2009; DE SOUZA *et al.*, 2010; BARRIAS *et al.*, 2013).

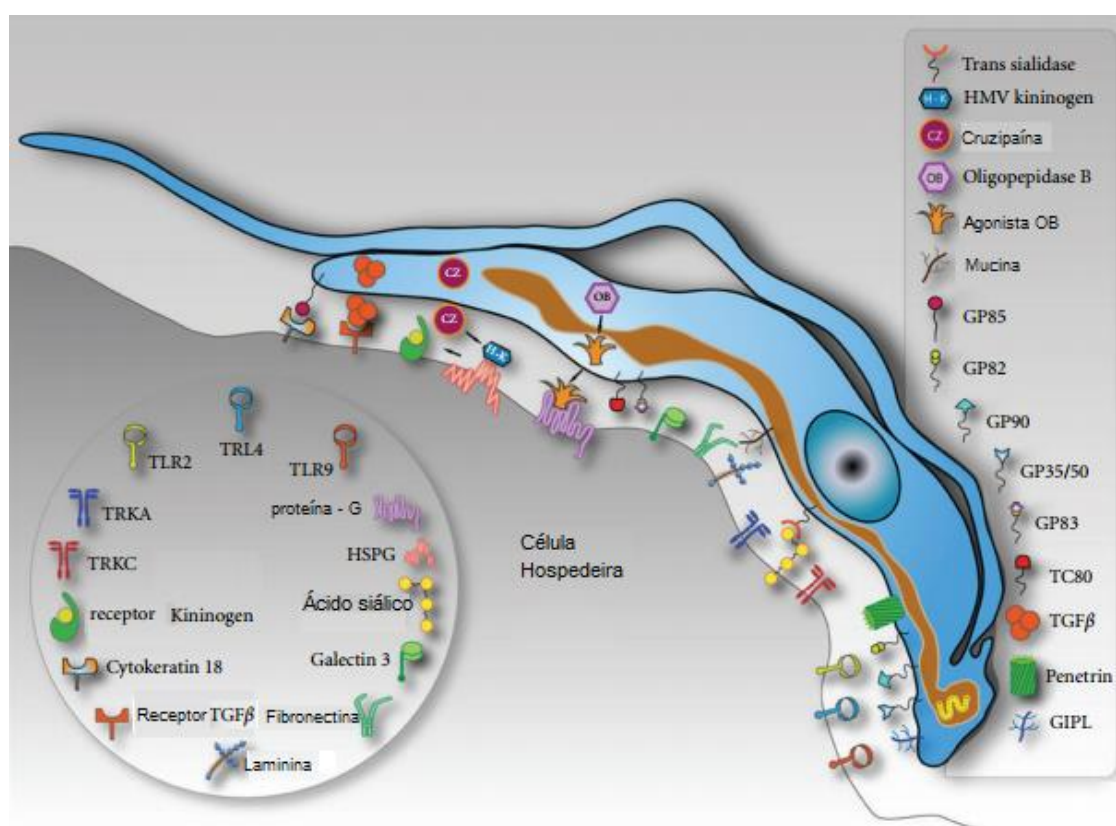
Os genes que codificam para as proteínas de superfície associadas a mucinas (MASP) estão organizados próximos a genes de mucinas e têm seu nível de expressão aumentado em formas tripomastigotas. Esta família de genes é altamente polimórfica e parece ter funções relacionadas a capacidade de *T. cruzi* evadir o sistema imune do organismo hospedeiro (ATWOOD *et al.*, 2005; EL-SAYED *et al.*, 2005b; BARTHOLOMEU *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2012).

Gp63 apresenta atividade de metaloprotease e um estudo onde foi realizada incubação com anticorpos anti-gp63 mostrou que houve bloqueio parcial da invasão de células hospedeiras por tripomastigotas, o que pode indicar que a interação de gp63 com o hospedeiro facilite a infecção (CUEVAS *et al.*, 2003; KULKARNI *et al.*, 2009). Outras proteínas com expressão aumentada em formas tripomastigotas são os membros da família de genes dispersos (DGF-1), que parecem estar relacionadas a habilidade de *T. cruzi* se ligar a proteínas da matriz extracelular de células hospedeiras durante a invasão (KAWASHITA *et al.*, 2009).

Outra proteína de superfície, agora não relacionada a interação com o hospedeiro vertebrado, é gp72, com expressão aumentada em formas epimastigotas e relacionada com a adesão do flagelo ao corpo com parasito. Outra provável função de gp72 é o desencadeamento da metaciclogênese, já que o bloqueio de gp72 por anticorpo inibiu a diferenciação (SHER e SNARY *et al.*, 1982; COOPER *et al.*, 1993).



Há ainda proteínas que aparecem expressas em mais de uma forma biológica de *T. cruzi*, como a protease cruzipaina que em formas epimastigotas é capaz de degradar albumina bovina do soro (BSA), hemoglobina e azocaseína em pH 5, mas que também pode ser encontrada em formas intermediárias entre amastigota-tripomastigota (BOMTEMPI *et al.*, 1989; CAZZULO *et al.*, 1989; SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1990). Outro exemplo são amastinas, que formam uma família multigênica que já teve membros identificados em formas epimastigotas e amastigotas em *T. cruzi* (TEIXEIRA *et al.*, 1994; KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013). Algumas das proteínas anteriormente citadas, além de proteínas do hospedeiro que participam da interação com o parasito, são mostradas na figura 4.



**FIGURA 4.** Representação esquemática de proteínas e receptores envolvidos na interação hipotética de um tripomastigota metacíclico de *Trypanosoma cruzi* com uma célula hospedeira.

**FONTE:** Adaptado de De Souza *et al.*, 2010)

**NOTA:** Proteínas encontradas em *T. cruzi*, como cruzipaina, mucina, gp 35/50, trans-sialidase, etc., aparecem interagindo com receptores e proteínas de um organismo hospedeiro. Se vê, por exemplo, uma trans-sialidase coletando ácido siálico desde a membrana da célula hospedeira e gp85 interagindo com a citoqueratina 18 (que compõe filamentos intermediários do citoesqueleto) do hospedeiro.



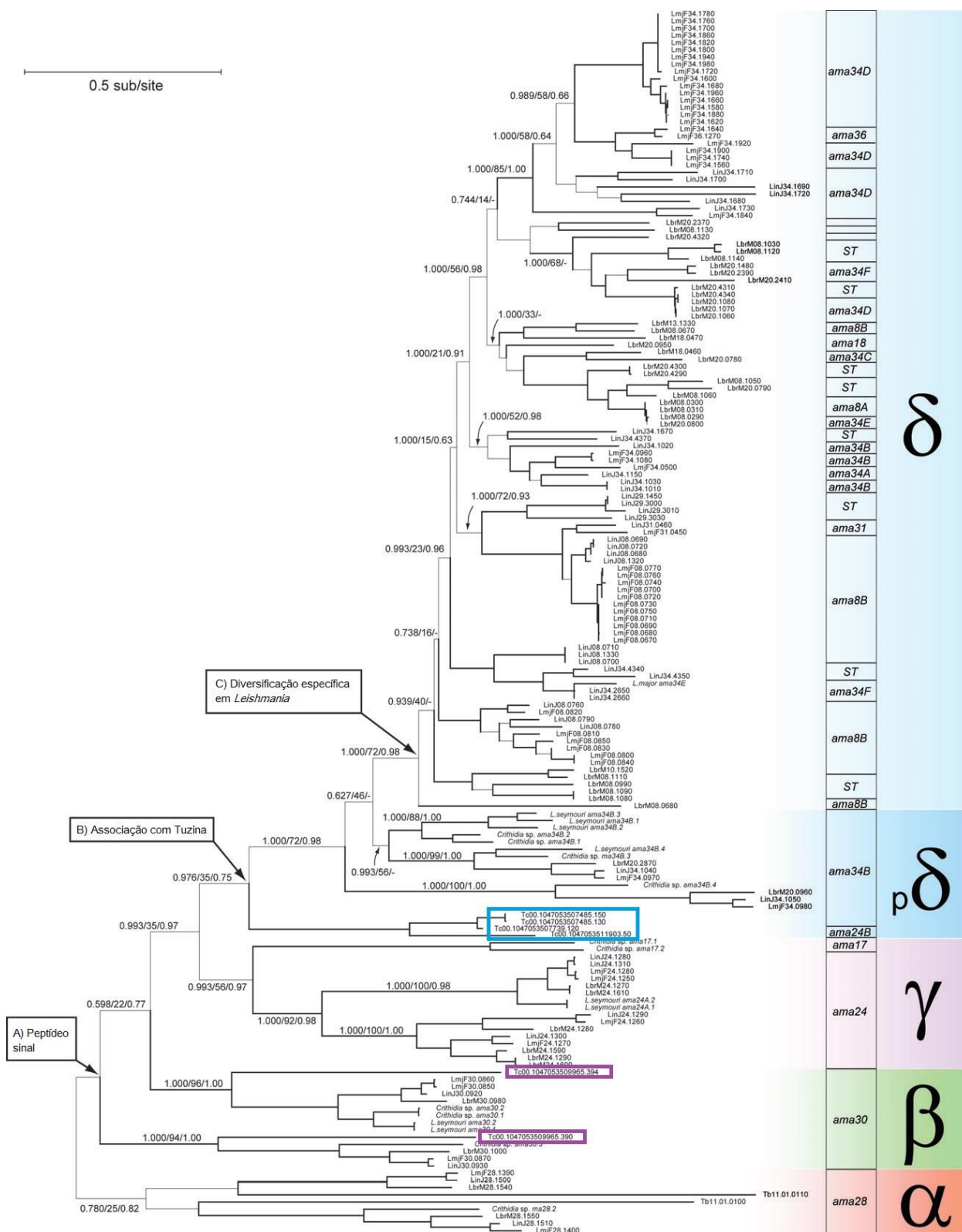
Com base nos dados de genoma de *Trypanosoma cruzi* (clone CL Brener), foram encontradas três cópias de genes que codificam para  $\delta$ -amastinas no cromossomo 34, e no cromossomo 26 foi encontrada uma cópia, então denominada p $\delta$ -amastina. Já no cromossomo 32 foi estimado haver duas cópias de  $\beta$ -amastinas, que aparecem em sequência e são consideradas as mais divergentes (JACKSON, 2010).

Das amastinas encontradas em diferentes cepas de *T. cruzi*, as  $\delta$ -amastinas presentes no cromossomo 34 apresentam um alto nível de identidade entre si (85 a 100%), estão na mesma unidade de transcrição policistrônica (UTP) e aparecem intercaladas por sequências que codificam para tuzina (proteína menos expressa e também de função desconhecida) (TEIXEIRA *et al.*, 1994; JACKSON, 2010; KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

A p $\delta$ -amastina foi recentemente nomeada como  $\delta$ -Ama40 e  $\delta$ -Ama50 (tendo em vista o genoma diploide do parasito e os códigos referentes aos alelos onde essas sequências codificadoras foram encontradas). Cabe ressaltar que  $\delta$ -Ama40 e  $\delta$ -Ama50 são mais divergentes das outras  $\delta$ -amastinas. As  $\beta$ -amastinas encontradas em *T. cruzi* divergem consideravelmente entre si, porém quando comparadas as sequências dessas proteínas em diferentes cepas, há grande similaridade. Elas são denominadas  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-amastina (TEIXEIRA *et al.*, 1994; KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

Quanto à localização de amastinas em *T. cruzi*, foi observado que as  $\delta$ -amastinas aparecem na superfície celular do parasito, como demonstrado por Teixeira e colaboradores, em 1995, assim como foi observado para  $\beta$ 1-amastina. Já as  $\beta$ 2-amastinas aparecem na superfície celular, mas também dispersas pelo citoplasma do protozoário. Foi detectada  $\delta$ -Ama40 em regiões pontuais do citoplasma, sugerindo que ela possa estar na membrana de alguma organela citoplasmática e, semelhante às demais amastinas fusionadas a GFP, essa também fracionou com as membranas celulares (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

A expressão das isoformas de  $\delta$ -amastinas, incluindo  $\delta$ -Ama40, está mais acentuada na forma amastigota do parasito, enquanto as  $\beta$ -amastinas têm sua expressão aumentada em epimastigotas, o que pode indicar que estas subfamílias desempenhem funções diferentes. Também há variação no nível de expressão das amastinas entre diferentes cepas, sendo que a cepa G, que é considerada de baixa virulência, expressa  $\delta$ -Ama40 em menor nível quando comparada a outras cepas e tem baixíssima expressão das outras  $\delta$ -amastinas, apresentando níveis praticamente indetectáveis, o que pode sugerir associação de amastinas com infectividade (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).



**FIGURA 6. Filogenia de genes de amastinas de diferentes espécies agrupados por máxima verossimilhança**

**FONTE:** Adaptado de JACKSON, 2010.

**NOTA:** O comprimento dos ramos está proporcional às distâncias evolucionárias. Nós basais são rotulados com três valores de suporte: probabilidade posterior Bayesiana/ estatística aLRT (teste da razão de verossimilhança aproximado) / *bootstrap* não paramétrico. Identificadores GeneDB são usados quando já foram publicados genomas daqueles organismos. A posição genômica de seqüências individuais está indicada à direita e genes derivados de regiões subtelo- méricas estão

rotulados como “ST”. Três principais eventos evolutivos destacados são: (A) aquisição de peptídeo sinal; (B) ligação de amastina à tuzina; (C) diversificação de delta-amastina apenas em *Leishmania* spp. A caixa azul destaca os genes de  $\delta$ -amastinas e p $\delta$ -amastina identificados até então em *T. cruzi* (Tc00.1047053507485.150, Tc00.1047053507485.130, Tc00.1047053507739.120 e Tc00.1047053511903.50) e as caixas roxas destacam as  $\beta$ -amastinas identificadas em um haplótipo de *T. cruzi* (Tc00.1047053509965.390 e Tc00.1047053509965.394).

As  $\delta$ -amastinas já foram utilizadas com sucesso em protocolos de imunização de camundongos contra infecção parasitária, um indício de que as amastinas podem ter relação com a infectividade do parasito (STOBER *et al.*, 2006). Em outro estudo que utilizou a superexpressão das  $\delta$ -amastinas em fusão à proteína verde fluorescente (GFP) foi observado, entre outros resultados, que as amastinas contribuíram para a sobrevivência do parasito, por aumentar sua taxa de metaciclogênese (diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas, infectivas), além de elevar a parasitemia tecidual no organismo hospedeiro (CRUZ *et al.*, 2012).

Em estudo com amastinas expressas em *Leishmania brasiliensis* viu-se que o silenciamento de uma  $\delta$ -amastina por RNAi alterou a taxa de divisão de formas amastigotas em macrófagos de camundongos infectados: amastigotas contendo a construção para silenciamento por RNAi se dividiram consideravelmente menos do que amastigotas do tipo selvagem, entre 48 e 72 horas após a infecção *in vitro*; em camundongos BALB/c infectados *in vivo* foi possível verificar a presença de amastigotas apenas nos animais infectados com parasitos do tipo selvagem, duas semanas após as infecções. Esses fenótipos nas infecções *in vitro* e *in vivo* foram revertidos após a re-expressão dessa  $\delta$ -amastina (mas agora resistente ao RNAi), sugerindo também que amastinas estejam relacionadas com a infectividade e multiplicação de tripanossomatídeos (DE PAIVA *et al.*, 2015).

Análises estruturais apontam considerável homologia entre amastinas de *Leishmania brasiliensis* (e outros tripanossomatídeos) e claudinas, proteínas que compõem junções de oclusão em diferentes tipos celulares de mamíferos e participam de interações celulares. Amastinas poderiam também estar envolvidas na interação entre parasitos e entre parasito-célula hospedeira (FURUSE *et al.*, 1998; SUZUKI *et al.*, 2014; DE PAIVA *et al.*, 2015; SOUZA-MELO, em andamento).

### 3 JUSTIFICATIVA

As proteínas amastinas, exclusivas de tripanossomatídeos e de expressão diferencial durante o ciclo de vida destes organismos, ainda não têm função conhecida, por isso a caracterização estrutural de suas subfamílias ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) pode auxiliar no entendimento do papel dessas proteínas. E, neste trabalho, buscamos estudar duas subfamílias de amastinas:  $\alpha$  e  $\beta$ -amastinas, encontradas em *T. cruzi*.

Amastinas já foram utilizadas com sucesso em protocolos de imunização, sugerindo que elas podem influenciar a virulência de *Trypanosoma cruzi* e que são potenciais candidatas para o desenvolvimento de vacinas. Caso a função destas proteínas esteja relacionada com a infectividade do parasito (como sugerido por CRUZ e colaboradores em 2012), os genes de amastinas podem ser alvos para o desenvolvimento de tratamentos para a Doença de Chagas e, como não há ortólogos de amastinas no homem, a terapia teria especificidade para o combate a tripanossomatídeos, preservando o paciente de possíveis efeitos caso houvesse homólogos de amastinas em humanos.

Porém, o estudo da função de genes e especialmente de famílias multigênicas (Ex: amastinas) de *T. cruzi* tem limitações, pois devido as peculiares características da biologia molecular do parasito ainda há relativamente poucas ferramentas de manipulação gênica disponíveis. Tendo em vista esta dificuldade, neste projeto de mestrado serão utilizadas estratégias que já tiveram sucesso para o estudo de outros genes, como a transfecção de vetores não integrativos no genoma de *T. cruzi* e a deleção por recombinação homóloga.

A localização celular das  $\alpha$ -amastinas em *T. cruzi*, que será possível pela transfecção de vetores não integrativos contendo a região codificadora de cada isoforma fusionada a proteína verde fluorescente; além da análise do nível de expressão e do arranjo cromossômico das  $\alpha$ -amastinas de *T. cruzi* (obtidos independentemente da localização) fornecerão importantes informações para a caracterização desta subfamília e também para a determinação das estratégias a serem futuramente empregadas para a manipulação gênica destas proteínas, visando a elucidação de suas funções.

A deleção das  $\beta$ -amastinas por recombinação homóloga, a análise das possíveis alterações fenotípicas causadas pelas deleções e do transcriptoma de parasitos selvagens e nocaute poderão fornecer indícios sobre a função destas isoformas em *T. cruzi*, o que auxiliará no entendimento dos papéis empregados pelas diferentes amastinas ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*.

## 4 OBJETIVO GERAL

Contribuir para a elucidação da função das proteínas amastinas de *Trypanosoma cruzi* pelo estudo das subfamílias  $\alpha$  e  $\beta$ : identificar e caracterizar as  $\alpha$ -amastinas além de realizar a deleção das  $\beta$ -amastinas e verificar as alterações fenotípicas causadas.

### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar *in silico* as  $\alpha$ -amastinas quanto sua conservação entre os Tripanossomatídeos e presença dos domínios conservados;
- Avaliar a localização sub-celular das  $\alpha$ -amastinas utilizando proteínas de fusão a GFP;
- Verificar o arranjo genômico das  $\alpha$ -amastinas em diferentes linhagens de *T. cruzi*;
- Bloquear a expressão das  $\beta$ -amastinas utilizando deleção por recombinação homóloga;
- Avaliar alterações fenotípicas na taxa de crescimento dos parasitos nocaute.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 MEIOS DE CULTIVO E REAGENTES

A seguir há dois quadros, sendo que a tabela 1 se refere aos meios de cultivos e a tabela 2 aos reagentes utilizados neste trabalho.

**TABELA 1: Meios de cultivo utilizados e suas composições**

MEIO DE CULTIVO	COMPOSIÇÃO	ORGANISMO CULTIVADO
LA – Luria Bertani – Ágar	Triptona 1%; extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%, e 15 g/L de ágar	<i>Escherichia coli</i>
LB – Luria Bertani	Triptona 1%; extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%	<i>E. coli</i>
LIT completo	Infuso de fígado 0,5%; NaCl 75,3 mM; KCl 5,4 mM; glicose 10 mM; bactotriptose 0,5%; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 56,4 mM; hemina 0,0025%; extrato de levedura 15 g/L, 1% de solução com Penicilina 10000 U e estreptomicina 10000 µg (PenStrep - Sigma) além de 10% de SFB (Cultilab) inativado	<i>T. cruzi</i>

**TABELA 2: Reagentes, corantes e tampões utilizados e suas composições**

REAGENTE	COMPOSIÇÃO
Azul de Comassie	Azul de Comassie R-250 0,3% (p/v); metanol 45% e ácido acético glacial 10%
Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1)	Clorofórmio (24 partes) e álcool isoamílico (1 parte)
Fenol/clorofórmio (25:24:1)	Fenol saturado (25 partes); clorofórmio (24 partes) e álcool isoamílico (1 parte)
PBS 10X	NaCl 1,37 M; KCl 27 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 18 mM; pH 7,4
PBSG	PBS 1x e glucose 1%
PBS/T 0,05%	PBS 1x e Tween 20 a 0,05%
Ponceau S	Ponceau S 0,1% (p/v) e ácido acético 5%
Solução de armazenamento para coloração com prata	Etanol 25% e glicerol 1,5%
Solução de bloqueio para <i>Western Blot</i>	PBS 1x; Tween 20 a 0,05% e leite em pó desnatado 5%
Solução de Denhardt 50x	Ficoll 40 1%; polivinilpirrolidona 1% e BSA 1%
Solução de depuração para <i>Southern blot</i>	HCl 125 mM
Solução de desnaturação para <i>Southern blot</i>	NaOH 500 mM; NaCl 1,5 M
Solução de lise para “mini prep”	NaOH 0,2 mM; SDS 1%
Solução de neutralização de <i>Southern blot</i>	Tris-HCl 500 mM; NaCl 500 mM
Solução de nitrato de prata	NaOH 0,2%; NH <sub>4</sub> OH 500 mM; AgNO <sub>3</sub> 60 mM

(Continua)



TABELA 2: Reagentes, corantes e tampões utilizados e suas composições

(Conclusão)

REAGENTE	COMPOSIÇÃO
Solução de pré-hibridação	SSC 5x; Denhardt 5X, SDS 1% e DNA de esperma de salmão (desnaturado por calor) 100 µg/mL
Solução ESP	EDTA 500 mM, laurilsarcosinato 1% e pronase 0,5 mg/mL
Solução reveladora de coloração com prata	Ácido acético 4 mM e formaldeído 0,37%
Solução GET	Tris-HCl 25 mM pH 8,0; glicose mM e EDTA 10 mM
SSC 10x	NaCl 1,5 M; citrato de sódio 150 mM pH 7,0
Tampão de amostra para DNA 10x	Ficoll 400 25%; azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol FF 0,25%
Tampão de amostra para proteína 1x	Tris-HCl 50mM; pH 6,8, Glicerol 10%; SDS 2%; DTT 5mM e azul de bromofenol 0,1%
Tampão de eletroforese para SDS-PAGE	Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM e SDS 0,1%.
Tampão de eletroporação	KCl 120 mM; CaCl <sub>2</sub> 0,15 mM; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM; Hepes 25 mM; EDTA 2 mM pH 8.0 e MgCl <sub>2</sub> 5 mM
Tampão de lise/digestão	NaCl 10 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 10 mM e SDS 0,5%
Tampões para transferência de <i>Western blot</i>	ÂNODO 1: Tris base 300 mM pH 10; metanol 20% ÂNODO 1: Tris base 25 mM pH 10; metanol 20% CÁTODO 1: Tris base 25 mM pH 10; ácido capróico 40 mM e metanol 20%
TBE 10x	Tris-Base 890 mM; ácido bórico 890 mM; EDTA 20 mM

## 5.2 CULTIVO DE ORGANISMOS

### 5.2.1 Bactérias

Neste trabalho foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* linhagem DH10B/[Sm R; F' *proAB* + *lacZ*ΔM15] (SAMBROOK *et al.*, 1989), que foram mantidas em glicerol 50% a -20 °C e cultivadas em meio de cultura líquido (LB) ou sólido (LA). A composição destes meios pode ser vista na seção anterior, tabela 2.

### 5.2.2 Parasitos

Foram utilizados neste trabalho parasitos da espécie *Trypanosoma cruzi* das seguintes linhagens: clones CL Brener, DM28c e Sylvio X-10; cepas G e Y. Formas epimastigotas desses parasitos foram mantidas em fase logarítmica de crescimento em meio líquido LIT completo a temperatura de 28 °C (CONTRERAS *et al.*, 1988).

### 5.3 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Para possibilitar as análises *in vitro*, foram desenhados oligonucleotídeos que amplificaram as regiões codificadoras das  $\alpha$ -amastinas e  $\beta$ -amastinas de *T. cruzi*, além de genes localizados próximos às  $\beta$ -amastinas. O desenho foi realizado pela ferramenta oligocalc (KIBBE, 2007) e além dos oligonucleotídeos desenhados especialmente para este trabalho, foram utilizados outros que já estavam no laboratório. A relação de nomes e sequências de *primers* utilizados neste trabalho está na tabela 3.

A maioria dos iniciadores contém em sua sequência sítios que possibilitaram a clivagem enzimática, facilitando a clonagem dos fragmentos em vetores plasmidiais. Não foram incluídos códons de parada nas sequências de amplificação das regiões codificadoras de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amastinas, o que permite adicionar a sequência codificadora para a proteína verde fluorescente (GFP) na região 3' do fragmento amplificado, para que GFP pudesse servir como marcador e sua fluorescência pudesse ser visualizada e/ou quantificada.

Para a construção dos cassetes de deleção das  $\beta$ -amastinas, os iniciadores desenhados amplificam as regiões chamadas UP32 e DN32, que têm homologia com o genoma do parasito, permitindo a recombinação e interrupção simultânea dos genes de interesse. Foi adicionado um códon de parada no iniciador para a região o UP32, para bloqueio da tradução de  $\beta$ 2-amastina. E considerando a homologia de DN32, sua recombinação no genoma ocorre logo após o códon de início de  $\beta$ 1-amastina, dessa forma impedindo sua tradução.

**TABELA 3: Nomes e sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho**

GENE	SIGLA	SEQUÊNCIA 5'→3'	SÍTIOS DE RESTRIÇÃO
Alpha1_For	$\alpha$ 1_F	TTGCTCTAGAATGCCAACAGGGAGGCGGAC	<i>Xba</i> I
Alpha1_Rev	$\alpha$ 1_R	TACGGATCCCCACTGTAAGAGCAAACAACGCTAG	<i>Bam</i> HI
Alpha2_For	$\alpha$ 2_F	GTGTCTAGAATGAGTTTTCTGCCAGATCGG	<i>Xba</i> I
Alpha2_Rev	$\alpha$ 2_R	AGCGGATCCCATAAAAATGCGGCACGATACACG	<i>Bam</i> HI
32UPCon	32Con	ACGTGTTTCGGCGTCATCGA	—
32Up_For	32UP_F	TTGAAGCTTTTGCATACTAGGTGTGCGCCTGC	<i>Hind</i> III
32Up_Rev	32UP_R	AGTTCCGCAAGATCTCCCTTTGTACACG	<i>Bgl</i> II
32Dn_For	32DN_F	CAGCTCGAGTTGTCATCCGGAACGTGC	<i>Xho</i> I
32Dn_Rev	32DN_R	AGCTCTAGAGGATCCAGAAGACCACAGAACTGC	<i>Xba</i> I/ <i>Bam</i> HI
HX1 5'out	HX1_5'out	TTTCTTAGTGAATCCGCTGC	—
TcCLB. 509965.390_For	$\beta$ 1_F	CCTAGGAGGATGTCTGAAGAAGAAG	<i>Avr</i> II
TcCLB. 509965.390_Rev	$\beta$ 1_R	AGATCTCGAGCACAATGAGGCCAG	<i>Bgl</i> II

(Continua)

**TABELA 3: Nomes e sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho (Conclusão)**

GENE	SIGLA	SEQUÊNCIA 5'→3'	SÍTIOS DE RESTRIÇÃO
TcCLB. 509965.394_For	β2_F	<u>TCTAGAT</u> GGGCTTCGAAACGCTTGC	<i>Xba</i> I
TcCLB. 509965.394_Rev	β2_R	<u>GGATCCCC</u> AGTGCCAGCAAGAAGACTG	<i>Bam</i> HI
TcCLB. 509965.380_F	380_F	TACGTATGGTCCTCGCATGT	–
TcCLB. 509965.380_R	380_R	CCTCTACAAGGTCATCGCAA	–
TcCLB. 509965.400_F	400_F	CTGCCAGAAGCCAACTATGA	–
TcCLB. 509965.400_R	400_R	GCTCTAGTGCCTTCCCAAAC	–
Higro_For	Higro_F	AAAAGAATTCATGAAAAAGCCTGAACTCAC	<i>Eco</i> RI
Higro_Rev	Higro_R	TTTTGAATTCATTCCTTTGCCCTCGGAC	<i>Eco</i> RI
Neo 5'out	Neo_5'out	CGGAGAACCTGCGTGCAATC	–
Neo 3'out	Neo_3'out	CGCATCGCCTTCTATCGCCTTC	–

## 5.4 VETORES

Na tabela 4 estão descritos os vetores plasmidiais utilizados neste trabalho.

**TABELA 4: Vetores plasmidiais utilizados e principais características**

VETOR	CARACTERÍSTICAS	RESISTÊNCIA	REFERÊNCIA
pTZ57R/T	Vetor de clonagem que possui lacZ.	Ampicilina (Amp <sup>R</sup> )	Life Technologies
pTREX_GFP	Vetor de integração ao genoma de <i>T. cruzi</i> e expressão da proteína verde fluorescente (GFP).	Ampicilina (Amp <sup>R</sup> ) Neomicina (Neo)	DaROCHA <i>et al.</i> , 2004b
pTREX_Alfa1GFP	Vetor de integração ao genoma de <i>T. cruzi</i> e expressão de α1-amastina fusionada a GFP. A região codificadora de α1-amastina foi amplificada do genoma de CL Brener.	Ampicilina (Amp <sup>R</sup> ) Neomicina (Neo)	Este trabalho
pTREX_Alfa2GFP	Vetor de integração ao genoma de <i>T. cruzi</i> e expressão de α2-amastina fusionada a GFP. A região codificadora de α2-amastina foi amplificada do genoma de CL Brener.	Ampicilina (Amp <sup>R</sup> ) Neomicina (Neo)	Este trabalho
pUP32NeoDN32	Vetor para deleção por recombinação homóloga dos genes de β-amastinas em um cromossomo homólogo do par 32 de <i>T. cruzi</i> . As regiões UP32 e DN32 foram amplificadas do genoma de CL Brener.	Ampicilina (Amp <sup>R</sup> ) Neomicina (Neo)	Este trabalho

(Continua)

**TABELA 4: Vetores plasmidiais utilizados e principais características**

VETOR	CARACTERÍSTICAS	RESISTÊNCIA	(Conclusão)
			REFERÊNCIA
pUP32HigroDN32	Vetor para deleção por recombinação homóloga dos genes de $\beta$ -amastinas do outro cromossomo homólogo do par 32 de <i>T. cruzi</i> . As regiões UP32 e DN32 foram amplificadas do genoma de CL Brener.	Ampicilina (Amp <sup>R</sup> )  Higromicina (Higro)	Este trabalho

## 5.5 ANÁLISES *in silico*

A partir da sequência de aminoácidos de diferentes amastinas, foram realizados alinhamentos com a ferramenta tBlastn (Basic Local Alignment Search Tool), utilizando como alvo de comparação todo o genoma de *T. cruzi*, considerando desta forma todos os dados anotados do sequenciamento do clone CL Brener presentes no banco de dados do consórcio TriTrypDB (TRITRYPDB, 2016), e não apenas aqueles que foram incluídos na montagem de cromossomos. O resultado mostrado posteriormente é de uma das pesquisas, quando utilizada uma  $\delta$ -amastina (de código TcCLB.507739.120).

Deste alinhamento foi possível verificar sequências do genoma de CL Brener que possuem similaridade. Algumas delas já estão nomeadas como proteínas amastina ou semelhante a amastina, porém foram encontradas outras regiões que não haviam sido identificadas como amastinas até o momento.

Para as análises *in silico* destas sequências, foram utilizados programas como ORFfinder, (ferramenta disponível na página do NCBI - National Center for Biotechnology Information), que procura por fases abertas de leitura (ORFs); PROTTER (OMASITS *et al.*, 2014) que faz predições de estrutura secundária de proteínas de membrana; a ferramenta SMART v.7 (Simple Modular Architecture Research Tool) (LETUNIC *et al.*, 2012) para análise de domínios proteicos, além de CLUSTAL Omega (SIEVERS *et al.*, 2011) que realiza alinhamentos entre sequências e a ferramenta WebLogo3, que pode usar o alinhamento entre diversas sequências de genes para evidenciar a conservação dos aminoácidos (CROOKS *et al.*, 2004).

Após pesquisas utilizando os dados de genoma de CL Brener, realizamos também busca por amastinas em dados de genoma de outras cepas e clones de *T. cruzi*, da subespécie *Trypanosoma cruzi marinkellei*, além de genomas de outros tripanossomatídeos, os quais são citados na tabela 5. E considerando as amastinas previamente classificadas

em 2010 e as encontradas neste trabalho, foram realizados alinhamentos com CLUSTAL Omega e filogenias com a versão 4.5.4 do programa SeaView (GOUY *et al.*, 2010).

**TABELA 5: Informações gerais sobre genomas consultados neste trabalho**

Identificação	Abreviatura	Versão (*)	Tamanho (Mpb)
<i>Leishmania brasiliensis</i> MHOM/BR/75/M2903	LbrM	16/12/2014	35.21
<i>Leishmania infantum</i> JPCM5	LinJ	16/01/2013	32.13
<i>Leishmania major</i> Friedlin	LmjF	16/01/2013	32.86
<i>Trypanosoma cruzi</i> marinkellei strain B7	TcMAK	1.0	38.65
<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener Esmeraldo-like	TcCLB	16/09/2014	32.53
<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener Non-Esmeraldo-like	TcCLB	16/09/2014	32.53
<i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c	TcDMC	13/11/2013	27.35
<i>Trypanosoma cruzi</i> Esmeraldo	TcESM	17/01/2013	38.08
<i>Trypanosoma cruzi</i> JR cl.4	TcJR4	17/01/2013	41.48
<i>Trypanosoma cruzi</i> Sylvio X10/1	TcSYL	02/10/2012	38.59
<i>Trypanosoma cruzi</i> Tula cl2	TcTUL	26/06/2013	83.51

OBS: (\*) Referente à última versão de genoma publicada em TriTrypDB

## 5.6 AMPLIFICAÇÃO DE DNA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A técnica da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) envolve dois oligonucleotídeos sintéticos que são preparados como complementares às sequências do DNA alvo em fitas opostas, em posições que definem as extremidades do seguimento a ser amplificado. Os oligonucleotídeos servem como iniciadores de replicação e neste trabalho foram estendidos pela enzima, a Taq DNA polimerase.

As reações de amplificação deste trabalho foram feitas em termociclador *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* e os sistemas de reação continham enzima Taq DNA polimerase (1-5 unidades por reação de 20-100 µL), dNTP 0,2 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; tampão de Taq DNA polimerase 1x (Invitrogen); e 0,5 M do par de iniciadores de interesse (AZEVEDO *et al.*, 2003-adaptado). Os parâmetros de ciclos de amplificação variaram conforme os oligonucleotídeos utilizados.

Para amplificação dos cassetes de deleção das β-amastinas foram montados sistemas com 10 reações de 100 µL seguindo as condições acima descritas. Após diagnóstico positivo das amplificações por eletroforese em gel de agarose, as reações foram agrupadas e tratadas com a enzima *DpnI* a 37 °C *overnight*, para clivagem do DNA do plasmídeo molde. Em seguida, o DNA destas reações foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 96% e 300 mM de acetado de sódio 3 M pH 5,2 e mantido a -20 °C por uma hora, foi

então centrifugado a 25000  $\times$ g por 20 minutos, lavado com etanol 70% e o *pellet* que contém o DNA, após secar, foi homogeneizado com água ultrapura estéril.

## 5.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para verificar a amplificação dos fragmentos de interesse, além de diagnósticos de clonagem e restrições enzimáticas, foram realizadas eletroforeses. Foram montados géis horizontais de agarose como descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989). Foi utilizada agarose padrão 1% (p/v) em tampão foi TBE 1X e as amostras foram diluídas em tampão de amostras de DNA. Foi utilizado marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas). Após o tempo de corrida (que, assim como a voltagem, variou de acordo com o propósito), o gel foi tratado com solução de brometo de etídeo (0,05%) por 15 minutos e visualizado sob luz ultravioleta (302 nm) em transiluminador UV. As imagens foram obtidas utilizando o EC3TM Imagem System - UVP BioImaging Systems.

## 5.8 RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DE DNA

Para possibilitar clonagem dos fragmentos amplificados nos vetores de interesse, foram realizadas reações individuais de restrições enzimáticas, utilizando o DNA precipitado proveniente de PCRs ou mesmo DNAs obtidos pelo método de lise alcalina (item 5.13). Cada reação foi composta por cerca de 100 ng de DNA, uma Unidade da enzima de interesse, tampão recomendado pelo fabricante (que quando não continha BSA em sua composição o recebia posteriormente na reação) e água ultrapura para complementar o volume das reações, que ficaram em estufa a 37 °C durante a noite.

Para digestões de DNA genômico de *T. cruzi* para *Southern blot*, foram utilizadas até 5 Unidades das enzimas de restrição para digerir 7  $\mu$ g de DNA, em reações com volume final de 30  $\mu$ L que contém, além de enzima e DNA, o tampão apropriado e água ultrapura. A incubação das reações também ocorreu a 37 °C durante a noite.

Os perfis de restrição foram verificados por eletroforeses em gel de agarose 1%.

## 5.9 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS

Após confirmação dos perfis de restrição enzimática por eletroforese, foram realizadas outras corridas, agora utilizando maiores volumes de reação e tampão de amostra, a fim de realizar purificação de DNA a partir de gel de agarose. Após a corrida e tratamento com brometo de etídeo, foram realizados cortes nos géis para retirada dos fragmentos de

interesse. Tais fragmentos foram purificados com o kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). A eficiência de purificação foi analisada por eletroforese.

## 5.10 REAÇÕES DE LIGAÇÃO

As reações de ligação foram feitas com fragmentos purificados ou vetor comercial. Os diferentes insertos e vetores foram ligados numa razão molar de 1:5. Nas reações de ligação foram adicionados tampão de ligação e 0,5 U de T4 DNA ligase. O sistema foi incubado a 16 °C durante a noite. Os tubos contendo os plasmídeos recombinados foram armazenados a 4 °C até sua utilização.

## 5.11 PREPARO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES

Inicialmente foi preparado um pré-inóculo com a estirpe de *Escherichia coli* DH10B, com 4 mL de meio de cultura Luria Bertani líquido (LB) suplementado com 80 µg/mL de Streptomicina, e incubado durante a noite a 37 °C, sob agitação de 160 rpm. No dia seguinte, utilizando 1 mL do pré-inóculo, um inóculo foi preparado com 100 mL de LB, sem adição de antibiótico e incubado a 37 °C sob agitação de 150 xg por aproximadamente 2 horas, até atingir DO<sub>600</sub> 0,5.

O inóculo foi transferido para tubos plásticos estéreis e mantido no gelo por 30 minutos, com posterior centrifugação a 4000 xg a 4 °C por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 30 mL de uma solução de CaCl<sub>2</sub> 100 mM. A suspensão foi centrifugada nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi novamente descartado, o *pellet* ressuscitado com 30 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM e centrifugado também a 4000 xg a 4 °C por 8 minutos. Esse sobrenadante foi descartado e cada sedimento foi ressuscitado em 1 mL de uma solução de CaCl<sub>2</sub> 85 mM em glicerol 15% e dividido em alíquotas de 100 µL em tubos de 1,5 mL estéreis. Os tubos com células não utilizadas para transformação bacteriana no mesmo dia foram armazenados a -80 °C.

## 5.12 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO E SELEÇÃO DE CLONES POSITIVOS

Os plasmídeos recombinados foram incubados com *E. coli* quimiocompetentes por 30 minutos no gelo (0,1 µg de plasmídeo para 100 µL de célula competente). Posteriormente, as bactérias desta mescla foram submetidas a um choque térmico (42 °C por 90 segundos)

e depois os tubos contendo as mesclas foram colocados no gelo por 2 minutos. Passado o tempo no gelo, foi adicionado 1 mL de meio de cultura LB sem antibiótico e os tubos foram então incubados a 37 °C por 45 minutos, sob agitação constante de 150 xg para que as bactérias pudessem se recuperar e iniciar a expressão dos genes de resistência ao antibiótico ampicilina. Posteriormente, o conteúdo dos tubos foi espalhado em placas de Petri contendo meio sólido Luria Bertani ágar ou LA e ampicilina 100 µg/mL. Estas placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas.

A triagem de clones positivos foi inicialmente feita por PCR de colônia, montando sistemas com todos os reagentes para PCR (utilizando primers que anelam dentro do vetor e de cada inserto, por exemplo) e colocando uma pequena parte de uma colônia ao invés do DNA. O programa utilizado no termociclador variou de acordo com o tamanho teórico do fragmento a ser amplificado e os iniciadores utilizados. Após término das reações, foram realizadas eletroforeses em géis de agarose 1% para avaliação de perfil de amplificação. As colônias consideradas clones positivos foram utilizadas para inóculos e extrações de DNA.

### **5.13 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA POR LISE ALCALINA**

As colônias inicialmente avaliadas como clones positivos por triagem com PCR de colônia foram utilizadas para preparo de inóculos (4 mL de LB suplementado com 200 µg/mL de ampicilina) que foram incubados durante a noite à temperatura de 37 °C sob agitação. Em cada inóculo foi feita a purificação de plasmídeo pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989, adaptado):

A cultura obtida pelo inóculo foi transferida a tubos plásticos de 2 mL, as células foram coletadas por centrifugação (14.000 xg, 2 minutos) e ressuspensas em 250 µL de solução GET contendo 10 µg/mL de RNase. Em seguida, as células foram lisadas com adição de 250 µL de uma solução de lise para “*mini prep*”. Em seguida, as proteínas, o DNA cromossômico, os restos celulares e o SDS foram precipitados com adição de 250 µL de acetato de potássio (3 M, pH 4,8). O conteúdo do tubo foi centrifugado (14.000 xg, 25 minutos) e o sobrenadante coletado foi precipitado pela adição de 0,6 volume de isopropanol, homogeneizado e centrifugado (14.000 xg, 20 minutos), sendo descartado o sobrenadante, lavado o pellet com etanol 70% e depois centrifugado (14.000 xg, 5 minutos). Após secagem, o *pellet* foi ressuspendido com 30 µL de água ultrapura autoclavada. A obtenção de DNA plasmidial em larga escala (necessária para transfecção dos vetores pTREX\_Alfa1GFP e pTREX\_Alfa2GFP) foi realizada utilizando o kit *QIAGEN Plasmid Plus Midi*.



A integridade dos DNAs obtidos foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e cada amostra foi quantificada por espectrofotometria em aparelho Nanodrop™ (Thermoscientific). E, para confirmação adicional das clonagens, foram realizadas reações de restrição enzimática, seguindo o protocolo indicado no item 5.8.

#### **5.14 TRANSFEÇÃO E SELEÇÃO EM *Trypanosoma cruzi***

Formas epimastigotas de CL Brener e G em fase exponencial de crescimento foram lavadas em tampão de eletroporação (DaROCHA *et al.*, 2004b) a 4 °C. Após ressuspensão em volume final de  $10^8$  células/mL no mesmo tampão, alíquotas de 0,4 mL ( $4 \times 10^7$  parasitos) foram misturadas a 50 µg de cada plasmídeo, em uma solução de, no máximo, 50 µL em cubetas de eletroporação de 2 mm de estéreis (BioRad). A mistura de soluções foi eletroporada utilizando o aparelho Gene Pulser System (BioRad).

Para CL Brener a condição de eletroporação utilizada foi: 300 volts e capacitância de 500 µF, sendo aplicados dois pulsos em um intervalo de 30 segundos. Já para cepa G foram aplicados dois pulsos de 450 volts e 500 µF, também entre intervalo de cerca de 30 segundos.

Após a transfecção, os parasitos foram transferidos para garrafas de cultura estéreis contendo 5 mL de meio LIT e incubadas a 27 °C. No dia seguinte à eletroporação foi adicionado o antibiótico G418 (Sigma), análogo a Neomicina. Para acompanhar a seleção de parasitos resistentes, foi realizada uma transfecção seguindo os mesmos parâmetros já apresentados, porém sem adição dos plasmídeos. A essa cultura controle chamamos *mock*. Considerou-se concluída a seleção a partir do momento que na cultura sem adição de DNA plasmidial não foram encontrados indivíduos viáveis (após aproximadamente 21 dias).

Para deleção das β-amastinas, primeiro foi transfectado o cassete de deleção UP32NeoDN32, realizada seleção com G418 e, após clonagem e análises, foi realizada a segunda transfecção, utilizando então parasitos já resistentes a G418. Nesse caso foi realizada a transfecção de UP32HigroDN32 e seleção com Higromicina B (Sigma) em meio que já continha G418, utilizando então dois antibióticos no meio. A seleção de parasitos duplo-resistentes foi considerada concluída quando a cultura *mock* não apresentava mais parasitos viáveis.

#### **5.15 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *Trypanosoma cruzi***

Foram realizadas extrações de DNA genômico de *T. cruzi* dos seguintes clones e cepas: CL Brener, Dm28c, Sylvio X10/1, G e Y selvagens ou transfectados. Para este

experimento foi utilizado protocolo adaptado ao encontrado em “*Manual Molecular Procedures – Training Course Molecular Epidemiology Leishmaniasis – Instituto Oswaldo Cruz, 2009*” para extração de DNA genômico de *Leishmania* sp.

Cerca de 40 mL de culturas de parasitos em fase logarítmica de crescimento foram centrifugadas a 5000 xg por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante de cada tubo foi descartado, o sedimento ressuspendido em 10 mL de PBS 1X e centrifugado a 5000 xg por 10 minutos a 4 °C. Cada sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento homogeneizado gentilmente em tampão de lise. Às mesclas foi adicionada RNase a uma concentração final de 100 µg/mL e os tubos foram incubados a 37 °C por uma hora. Passado este período, cada tubo recebeu proteinase K a uma concentração final de 100 µg/mL e foi incubado a 60 °C por pelo menos três horas (ou durante a noite). Após este período, foi adicionado a cada tubo um volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico e estas mesclas foram homogeneizadas por inversão por cerca de 3 minutos e centrifugadas 15000 xg por 10 minutos a 4 °C. A fase aquosa de cada amostra foi coletada e passada para um novo tubo, onde foi realizada extração com um volume de clorofórmio: álcool isoamílico e posterior centrifugação a 15000 xg por 10 minutos a 4 °C. Novamente foi coletada a fase aquosa e passada para um novo tubo, que recebeu um volume de isopropanol e 1/10 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2. O conteúdo de cada tubo foi homogeneizado e incubado a -20 °C por uma hora e depois centrifugado a 15000 xg por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante de cada tubo foi descartado e o *pellet* foi lavado com etanol 70% e centrifugado 5000 xg por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante final foi descartado, e após seco, o *pellet* foi ressuspendido em água ultrapura.

## 5.16 CLONAGEM DE PARASITOS TRANSFECTADOS

Para obtenção de clones de parasitos transfectados que contenham as construções de interesse foram realizadas diluições em culturas em fase exponencial de crescimento. Por meio de diluições seriadas chegou-se a uma diluição limitante contendo aproximadamente 0,5 parasito/mL em meio LIT completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino) contendo o antibiótico de seleção. Essa última diluição foi distribuída em placa de 24 poços (preparada com câmara úmida, contendo PBS 1X entre os poços), onde cada poço continha 1 mL. As placas foram incubadas a 28 °C até ser observado crescimento de parasitos em alguns poços (cerca de 40 dias), sendo então transferidos esses parasitos para garrafas de cultura que também contêm LIT completo e o antibiótico de seleção.

### **5.17 OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTEICO TOTAL DE EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi***

Foram utilizadas as linhagens CL Brener e G do tipo selvagem, além de transfectados contendo os vetores de localização apenas de GFP e de cada  $\alpha$ -amastina fusionada a GFP. Cerca de  $2 \times 10^7$  parasitos em fase exponencial de crescimento foram coletados do meio LIT por centrifugação (2500 xg por 10 minutos a 4 °C) e lavados com tampão PBS 1X gelado. Após centrifugação (2500 xg por 10 minutos a 4 °C), o sobrenadante foi descartado e a lise desses parasitos ocorreu com uso de 100  $\mu$ L de tampão de amostra para proteína. As amostras foram mantidas a -20 °C até sua utilização.

### **5.18 SDS-PAGE DO EXTRATO PROTEICO TOTAL DE *Trypanosoma cruzi***

Cerca de 20  $\mu$ L de cada extrato total ( $0,4 \times 10^7$ ) foram submetidos à separação eletroforética em gel de SDS-PAGE 12% de poliacrilamida. A corrida foi realizada em tampão para SDS-PAGE a 100 volts por 2 horas.

#### **5.18.1 Coloração com azul de Coomassie**

Os géis foram corados pela imersão em solução de azul de coomassie por cerca de 3 horas e depois descorados em solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético.

#### **5.18.2 Coloração com prata**

Terminada a separação por eletroforese, os géis foram lavados com água destilada por 5 minutos e fixados em metanol 50% durante 20 minutos, posteriormente foi repetida a lavagem com água, sendo que neste passo ocorreu por 10 minutos. A sensibilização com glutaraldeído 10% ocorreu durante 20 minutos e foi seguida de quatro lavagens de 10 minutos com água destilada. Após a última lavagem, cada gel foi incubado em solução de nitrato de prata por 20 minutos e passado este tempo foram realizadas duas lavagens de 5 minutos com água destilada. O próximo passo é a revelação, para tal os géis ficaram imersos em solução reveladora para coloração com prata até que fosse possível verificar o aparecimento de bandas. Vistas as bandas de interesse, a reação de revelação foi interrompida utilizando por 30 minutos a solução de parada, que consiste em ácido acético 1%. Cada gel foi mantido em solução de armazenamento.

### 5.19 WESTERN BLOT DE EXTRATO PROTEICO TOTAL DE *Trypanosoma cruzi*

Após separação eletroforética de proteínas em gel de SDS-PAGE foi montado um sistema para transferência semi-seca de proteínas, que consiste em cerca de 3 folhas de papel filtro embebidas na solução de transferência ânodo 1, outras 3 folhas embebidas na solução ânodo 2, uma membrana de nitrocelulose *Hybond-C* (Amersham) umedecida com a solução ânodo 2, assim como o gel de poliacrilamida que também foi umedecido nessa solução e, acima foram colocadas 3 folhas de papel filtro embebidas na solução cátodo 1. Esse sistema foi montado em uma célula de transferência semi-seca *Trans-Blot SD* (Bio-Rad) e transferência ocorreu durante 40 minutos a 10 volts.

Após a transferência, a membrana foi corada com *Ponceau S* até que fosse possível a visualização de bandas, depois foi brevemente lavada com água destilada e então incubada com solução de bloqueio para *western blot* durante a noite sob agitação constante (assim como as demais incubações). No dia seguinte a membrana foi lavada 3 vezes com PBS/T e incubada com o anticorpo primário (anti-GFP ou anti- $\alpha$ -tubulina, ambos monoclonais provenientes de camundongos) na diluição 1:3000 (em PBS/T) durante 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS/T e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário anti-*mouse* conjugado a peroxidase na diluição 1:3000 (em PBS/T). Finalmente, foram realizadas 3 lavagens com PBS/T e a membrana foi revelada utilizando o kit *ECL™ Western Blotting Systems* (GE Healthcare), por quimioluminescência em filme radiográfico *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare), seguindo instruções do fabricante. O tempo de exposição dos filmes variou de 2 a 20 minutos.

### 5.20 ENSAIO DE POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DO FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP) E *SOUTHERN BLOT*

Amostras de DNA dos clones CL Brener e Sylvio X10/1, e cepas Y e G, após extração descrita em 5.15, foram utilizadas em reações de restrição enzimática (como descrito em 5.8). Depois de confirmada a digestão completa por eletroforese em gel agarose 1%, as amostras foram aplicadas em agarose 0,8% e corridas em TBE 1X a 25 volts por 13 horas. O gel foi tratado com brometo de etídeo e fotografado com régua para obtenção das posições das bandas do marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas).

Para a transferência do DNA para uma membrana de *nylon* carregada positivamente, o gel foi tratado de acordo com o protocolo descrito por Southern e colaboradores (1975), com algumas modificações: sempre utilizando um agitador orbital para as lavagens, primeiramente, o DNA foi depurinado com uma solução 125 mM de HCl por 15 minutos em

seguida, incubado com solução de desnaturação por 30 minutos e depois tratado com solução de neutralização, em duas incubações de 15 minutos. Por fim, o gel foi incubado por 10 minutos em SSC 10X. Foi então montado um sistema para transferência por capilaridade do DNA para membrana Hybond-N+ (AMERSHAM) em solução SSC 10X. O tempo de transferência pode variar de 1 a 3 dias.

Após a transferência, foi feito o *crosslinking* do DNA na membrana em luz UV por cerca de 3 min e a membrana ficou armazenada a -20 °C até que fosse utilizada para hibridização com sonda referente à  $\alpha$ 1-amastina (item 5.22).

## 5.21 GEL DE ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

Na preparação das amostras de DNA do parasito para a PFGE, cultivos de formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento: clones CL Brener, Dm28c e Sylvio X10/1, cepas Colombiana, G e Y (todos selvagens) foram coletados do meio LIT mediante centrifugação de 3000 xg por 10 minutos a 4 °C. Logo após, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com PBSG. Após nova centrifugação, o pellet foi ressuspenso cuidadosamente para haver, aproximadamente,  $10^7$  parasitos em 50  $\mu$ L de PBSG. Igual volume de agarose de baixo ponto de fusão (LMP – *Low Melting Point*) 1%, à temperatura de aproximadamente 40 °C foi adicionado à suspensão de parasitos. Esta mistura foi, então, homogeneizada e distribuída em moldes com volume de 100  $\mu$ L para montagem de blocos com concentração final de parasitos de  $10^7$ .

Após solidificação (cerca de 10 min a 4 °C), os blocos foram mergulhados em solução ESP e mantidos por 48 horas a 37 °C. Após lavagem em EDTA 0,5 M pH 8,0, os blocos foram armazenados a 4 °C nesta solução até o momento da eletroforese (ENGMAN *et al.*, 1987). As bandas cromossômicas dos parasitos foram separadas através de gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE) conforme descrito por Cano *et al.* (1995), com algumas modificações. Os blocos contendo moléculas de DNA dos parasitos foram montados em gel que contém bloco referente a um padrão comercial de peso molecular (cromossomos de *Hansenula wingei*, BioRad). Os géis de PFGE foram preparados com agarose 1,2% em TBE 0,5X. As corridas eletroforéticas foram realizadas por 135 horas com voltagem constante (80 V) a 13 °C em aparelho “Gene Navigator System” (Pharmacia). Foram aplicados pulsos homogêneos (N/S, L/O) de 90 segundos por 30 horas, 200 segundos por 30 horas, 350 segundos por 25 horas, 500 segundos por 25 horas e 800 segundos por 25 horas, com interpolação. Após a separação cromossômica os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/mL), visualizado e fotografado sob luz

ultravioleta (302 nm) em transiluminador UV. As imagens foram obtidas utilizando o EC3™ Imagem System - UVP BioImaging Systems.

Em seguida, o DNA foi transferido para uma membrana Hybond-N+ (AMERSHAM) utilizando protocolo de *Southern blot* (como descrito em 5.20) e hibridizado com sonda referente à  $\alpha$ 1-amastina (item 5.22).

## 5.22 MARCAÇÃO DE SONDAS RADIOATIVAS E HIBRIDIZAÇÃO

Aproximadamente 50 ng de solução correspondente ao DNA molde para sonda de  $\alpha$ 1-amastina foi radioativamente marcado pelo método "*random primer*" com 50  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -32P]dCTP, 5  $\mu$ L da solução de hexanucleotídeos randômicos como iniciadores, 1 U de enzima Klenow e dNTPs não marcados. Após 1 hora de marcação a 37 °C, as reações foram bloqueadas com 0,05 M de EDTA pH 8,0 e a sonda foi desnaturada com 0,2 M de NaOH e aquecimento a 95 °C por 5 minutos.

Antes da incubação com as sondas, as membranas foram submetidas à pré-hibridização em aproximadamente 30 mL de solução de pré-hibridização em frascos apropriados mantidos em fornos giratórios a 60 °C por 1 hora. Após prévia desnaturação por fervura, as sondas marcadas foram adicionadas a 10 mL de solução de pré-hibridização. As membranas foram expostas a essa solução para hibridização e mantidas a 60 °C por aproximadamente 18 horas.

Após hibridização, as membranas foram lavadas uma vez a frio e duas vezes por 45 minutos em forno giratório com solução de lavagem (SSC 2X e SDS 0,2%) a 60 °C. Após a lavagem, as membranas foram seladas e expostas em filme de raios X (Kodak X-Omat™) a -70 °C em cassete e reveladas em diferentes tempos de exposição.

## 5.23 CITOMETRIA DE FLUXO

Epimastigotas de *T. cruzi* do tipo selvagem e que estavam expressando apenas GFP e  $\alpha$ -amastinas fusionadas a GFP foram monitoradas quanto a sua fluorescência por citometria de fluxo. Aproximadamente  $1 \times 10^6$  parasitos em fase exponencial de crescimento foram fixados em paraformaldeído 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente, depois centrifugados a 2500  $\times$ g por 5 minutos a 4 °C e os *pellets* lavados com PBS 1X e depois ressuspendidos também em PBS 1X.

As amostras foram passadas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ e avaliadas usando filtro FL1 (530/30 nm), que capta fluorescência verde, emitida em 509 nm. Como controle, a fluorescência dos parasitos selvagens foi medida e considerada como linha base.

Para as demais amostras, somente os eventos com fluorescência medida à direita da linha base foram considerados. As análises comparativas de fluorescência foram realizadas pelo programa Cyflogic 1.2.1.

## 5.24 MICROSCOPIA CONFOCAL

Parasitas do tipo selvagem e que estavam expressando apenas GFP e  $\alpha$ -amastinas fusionadas a GFP, durante a fase exponencial de crescimento, foram coletados (cerca de 500  $\mu$ L) por centrifugação (3000  $\times$ g por 5 minutos a 4 °C), lavados com PBS 1X e novamente centrifugados na condição anterior. Após descarte de sobrenadante cada sedimento foi ressuspensionado em 500  $\mu$ L de paraformaldeído 4% e incubado a temperatura ambiente por cerca de 10 minutos, para fixar a amostra. Os tubos contendo essas amostras foram centrifugados (3000  $\times$ g por 5 minutos a 4 °C) e os *pellets* lavados com PBS 1X e novamente centrifugados na condição anterior, sendo repetido esse passo de lavagem. Após descarte de sobrenadante o sedimento foi ressuspensionado em 500  $\mu$ L de PBS 1X e 0,1  $\mu$ g/mL de DAPI (Sigma), para marcação de DNA. Após incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (3000  $\times$ g por 5 minutos a 4 °C), cada sobrenadante foi descartado e os *pellets* ressuspensionados em cerca de 30  $\mu$ L de meio de montagem aquoso Fluoromount™ F4680 (Sigma). Para montagem de cada lâmina foram pipetados 2  $\mu$ L da amostra sobre lâmina de vidro e em seguida colocada lamínula.

As imagens foram obtidas pelo microscópio confocal multifóton modelo A1 MP+, marca Nikon em objetiva de 60x e zoom digital de 2 vezes. Para visualização foram utilizados os filtros FITC (excitação em 488 nm e emissão em 515 a 555 nm) e DAPI (excitação em 325 a 375 nm e emissão em 435 a 485 nm).

## 5.25 CURVA DE CRESCIMENTO

Para verificar se houve interferência na taxa de crescimento de formas epimastigotas transfectadas com vetores para expressão de  $\alpha$ -amastinas ou mesmo após integração de cada cassete de deleção das  $\beta$ -amastinas, foram analisadas parasitos clone CL Brener e cepa G, do tipo selvagem e carregando as construções mencionadas.

Para tal, essas culturas foram mantidas em fase exponencial de crescimento durante ao menos duas passagens com meio LIT completo sem adição de antibióticos e então inoculadas a  $0,5 \times 10^6$  parasitos por mL, sendo este considerado o dia 0. A partir do dia seguinte (dia 1), até o dia 7, as culturas foram contadas em duplicata em câmara de Neubauer a cada 24 horas.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISES *in silico* DA NOVA CLASSE DE AMASTINAS DE *Trypanosoma cruzi*

Amastinas são proteínas de superfície descritas inicialmente como específicas de formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* (TEIXEIRA *et al.*, 1994). Tais proteínas também foram encontradas em outros tripanossomatídeos, como *Leishmania donovani*, *Leptomonas seymouri* e *Crithidia* spp (WU *et al.*, 2000; JACKSON, 2010).

A estrutura secundária predita para a maioria destas proteínas compreende quatro domínios transmembrana, dois domínios extracelulares e as extremidades N-terminal e C-terminal voltadas para o citosol. No domínio extracelular localizado entre as duas primeiras regiões transmembrana de amastinas há aminoácidos altamente conservados, como três resíduos de cisteína, um de glicina, um de triptofano e uma treonina. A região entre as duas primeiras cisteínas anteriormente mencionadas contém uma sequência altamente conservada (C-[IVLYF]-[TS]-[LFV]-[WF]-G-X-[KRQ]-X-[DENT]-C), encontrada em todos os genes homólogos de amastina dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* e exclusiva para esta família de proteínas, a chamada “assinatura da amastina” (ROCHETTE *et al.*, 2005).

A partir de análises filogenéticas de genes ortólogos de amastinas em diferentes tripanossomatídeos, foi proposta a classificação dessas proteínas em subfamílias ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) (JACKSON, 2010). Foram encontrados representantes das quatro subfamílias em diversas espécies de *Leishmania* e isoformas de  $\delta$ , e  $\beta$  em *T. cruzi* (JACKSON, 2010; KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

Recentemente, utilizando diferentes sequências de aminoácidos de  $\beta$ - e  $\delta$ -amastinas de *T. cruzi*, foram realizadas pesquisas com a ferramenta de alinhamento *Tblastn* contra todos os dados de sequência, ou seja, considerando tanto sequências montadas em cromossomos e *contigs* de *T. cruzi* (clone CL Brener) existentes no banco de dados do consórcio TriTrypDB (TRITRYPDB, 2016).

Como resultado das buscas, além das sequências já anotadas como amastinas e que estão montadas em cromossomos, foram encontrados *contigs* sem predição de genes. Na tabela 6 estão os resultados de uma das pesquisas, quando foi utilizada uma sequência de  $\delta$ -amastina (TcCLB.507739.120), esses *contigs* também foram encontrados quando utilizadas outras amastinas no *tblastn*.

Considerando esses *contigs* sem predição de genes onde foram encontradas amastinas, alguns (9) têm alta similaridade e correspondem a  $\delta$ -amastinas não montadas no genoma, outro corresponde a  $\beta$ 2-amastina e, os demais, a prováveis amastinas mais divergentes. Em uma inspeção visual nesses últimos *contigs* mencionados, foi constatada a



conservação de resíduos de aminoácidos presentes na assinatura das amastinas, tais como: cisteínas, triptofano, treonina e glicina. Também foi observado que os *contigs* Tcruzi\_6279 e Tcruzi\_12631 contêm as maiores regiões homólogas às amastinas da pesquisa. Sendo assim, as demais análises serão realizadas com estas sequências.

**TABELA 6: *Contigs* que codificam novas amastinas de *T. cruzi* (clone CL Brener) identificadas pelas análises de tblastn depositados no TriTrypDB.**

<i>Contig</i>	Tamanho (pb)	Orientação	Amastina	e-value	Similaridade (%)
Tcruzi_17921	1007	Positiva	$\delta$	4.2e-88	98
Tcruzi_16637	934	Positiva	$\delta$	4.5e-88	98
Tcruzi_3954	1786	Positiva	$\delta$	1.6e-75	89
Tcruzi_25863	957	Negativa	$\delta$	8.2e-55	92
Tcruzi_32657	1045	Negativa	$\delta$	7.7e-53	89
Tcruzi_11436	1051	Positiva	$\delta$	1.2e-29	91
Tcruzi_24593	960	Negativa	$\delta$	8.9e-26	98
Tcruzi_24722	826	Negativa	$\beta 2$	8.5e-15	45
Tcruzi_12631 <sup>a</sup>	2300	Negativa	2	3.3e-07	41
Tcruzi_16532	1409	Negativa	2	1.0e-06	41
Tcruzi_13226	3176	Negativa	2	3.7e-06	41
Tcruzi_6279 <sup>a</sup>	3854	Negativa	1	0.00095	43
Tcruzi_17610	2176	Positiva	1	0.00096	43

<sup>a</sup> *Contigs* que contêm distintas sequências homólogas às amastinas

A partir dos *contigs* Tcruzi\_6279 e Tcruzi\_12631 foi realizada a predição de fase aberta de leitura utilizando ORFfinder (ferramenta disponível na página do NCBI - *National Center for Biotechnology Information*) e obtenção da sequência de aminoácidos que apresentou identidade de sequências com as amastinas. Como pode ser observado na TABELA 7, estes *contigs* apresentam sequências que codificam prováveis amastinas de tamanho bastante superior tanto às outras amastinas já identificadas em *T. cruzi*: enquanto  $\delta$ -,  $\delta$ -Ama40/50,  $\beta$ -1 e  $\beta$ -2 amastinas apresentam 174, 194, 178 e 185 aminoácidos, respectivamente, as prováveis amastinas dos *contigs* Tcruzi\_6279 e Tcruzi\_12631 apresentam 289 e 387 aminoácidos, respectivamente.

**TABELA 7: Informações sobre as sequências de aminoácidos encontradas nos *contigs* Tcruzi\_6279 e Tcruzi\_12631**

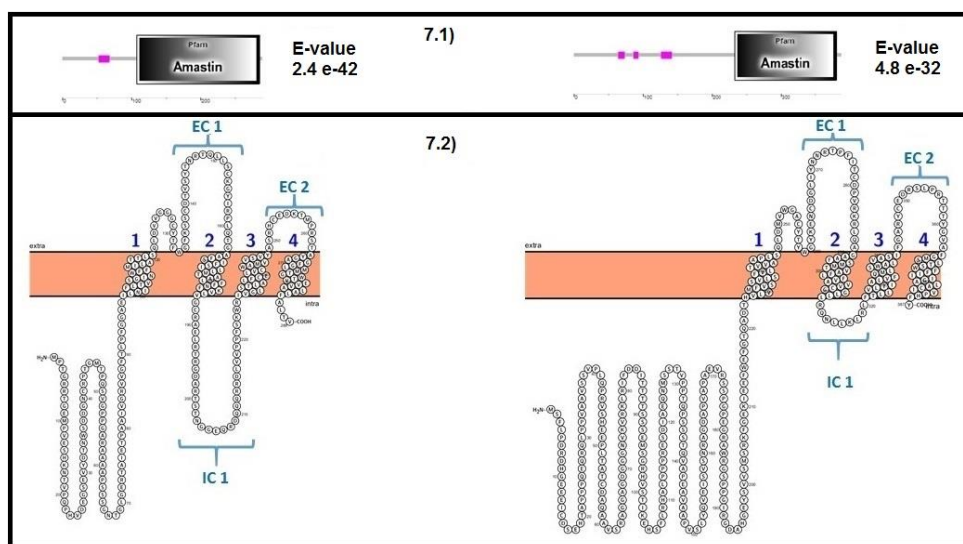
	ORF (posição)	Tamanho da Proteína (aa)	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico pI
Tcruzi_6279	249 – 1118	289	31,20	8,12
Tcruzi_12631	1060 – 2223	387	42,08	5,87

A fim de obter melhores evidências de que estas sequências correspondem a novas amastinas de *T. cruzi*, as sequências polipeptídicas foram submetidas a pesquisa por domínios conservados e predição de regiões transmembrana (software SMART). Utilizando o programa PROTTER (Omasits *et al.*, 2014), foram montadas topologias para as prováveis amastinas destes *contigs* Tcruzi\_6279 e Tcruzi\_12631. Como pode ser visto na figura 7, tais

sequências são reconhecidas como amastinas e a veracidade deste dado pode ser confirmada pelo baixo *e-value*.

Na predição de topologia confirmada pelo programa TMHMM server 2.0 (KROGH *et al.*, 2001), além das quatro regiões transmembrana, também foi apontada presença de longa extremidade N-terminal para os genes contidos em ambos os *contigs* Tcruzi\_6279 e Tcruzi\_12631, o que difere do encontrado para as outras amastinas de *T. cruzi*: enquanto as  $\delta$ -amastinas (incluindo  $\delta$ -Ama40 e  $\delta$ -Ama50) apresentam cerca de 6 aminoácidos,  $\beta$ 1 possui 19 e  $\beta$ 2, 12, as prováveis novas amastinas dos *contigs* Tcruzi\_6279 e Tcruzi\_12631 apresentam 97 e 223 aminoácidos, respectivamente.

A extremidade carboxiterminal dessas prováveis amastinas possui tamanho similar ao das outras amastinas (diferindo apenas de  $\delta$ -Ama40 e  $\delta$ -Ama50, que possuem regiões mais longas). Essas diferenças de tamanho e sequência das regiões N- e C-terminal podem influenciar no endereçamento e até na função destas proteínas.



**FIGURA 7. Identificação de domínios e regiões transmembrana das prováveis proteínas amastinas codificadas pelos *contigs* Tcruzi\_6279 e Tcruzi\_12631**

**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA: 7.1)** A partir de análises pelo programa SMART, que utilizou informações do banco de dados Pfam, foi confirmado que as regiões codificadoras encontradas nos *contigs* analisados são de membros da família multigênica das amastinas. Uma das ORFs contidas no *contig* Tcruzi\_6279 codifica para uma amastina (esta predição possui *e-value* de 2.4 e-42) e a ORF contida no *contig* Tcruzi\_12631 codifica para uma amastina (predição com *e-value* de 4.8 e-32); **7.2)** Na predição de topologia aparecem 4 domínios transmembrana para ambas as sequências de aminoácidos, sendo a imagem da esquerda referente ao encontrado no *contig* Tcruzi\_6279 e a da direita, da identificação de uma provável sequência proteica encontrada no *contig* Tcruzi\_12631.

Tendo essas determinações de prováveis domínios corroborado a hipótese de que estas seriam novas amastinas de *T. cruzi*, realizamos novas pesquisas, agora em busca de prováveis amastinas presentes em outras cepas e clones com anotações de genoma

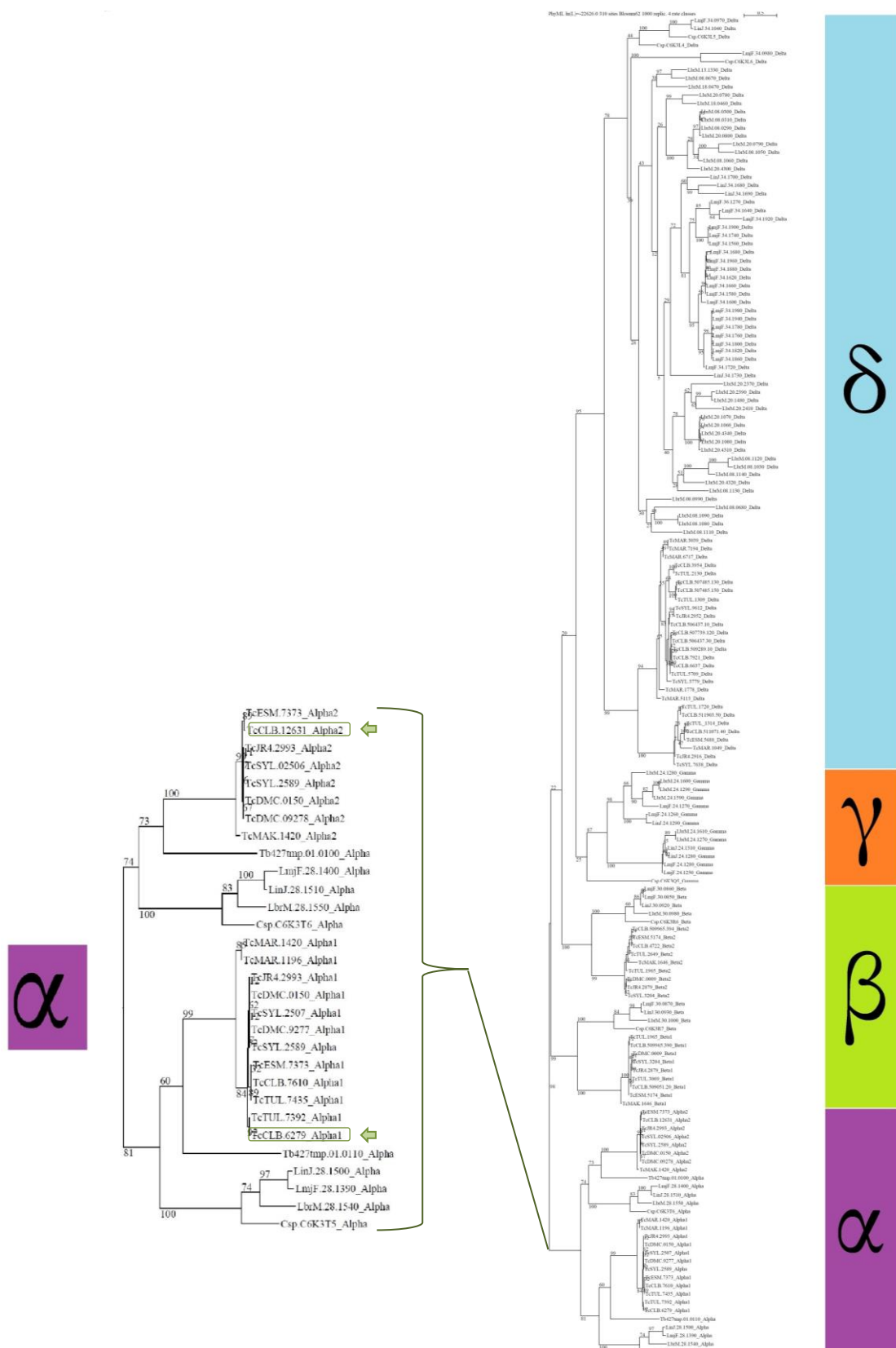
disponíveis em TriTrypDB (Dm28c, Esmeraldo, JR cl4, Tula cl2, Sylvio x10/1 e da subespécie *T. cruzi* marinkellei, strain B7).

Posteriormente foram realizadas análises comparativas com as sequências de amastinas identificadas e classificadas por Jackson (2010) em *T. cruzi*, *Crithidia* sp., *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania infantum* e *Leishmania major*, na tentativa de classificar as novas amastinas. Para isto, as sequências de todas as amastinas foram alinhadas utilizando ClustalO (Clustal Omega) e depois utilizadas para análise filogenética com o software Seaview4. Como pode ser visto na figura 8, estas duas novas amastinas estão agrupadas entre as  $\alpha$ -amastinas de *Crithidia* sp e Leishmanias.

Esta filogenia (com exceção da classificação de  $\alpha$ -amastinas em *T. cruzi*), ratifica as análises realizadas em 2010 por Jackson, e em 2013 por Kangussu-Marcolino e colaboradores. Uma das  $\alpha$ -amastinas presentes em *Leishmania major* (LmjF28.1390\_alpha) e uma de *Crithidia* sp (Csp\_AS87874.1\_alpha) parece mais próxima à amastina localizada no *contig* Tcruzi\_6279 (nomeada aqui como  $\alpha$ 1-amastina) e, as  $\alpha$ -amastinas presentes em *Leishmania major* (LmjF28.1400\_alpha) e *Crithidia* sp (Csp\_AS87875\_alpha) estão mais próximas à amastina localizada no *contig* Tcruzi\_12631 ( $\alpha$ 2-amastina).

Levando em conta os dados de conservação da sequência aminoacídica e também observando a classificação das novas amastinas encontradas no presente trabalho, é proposto que *T. cruzi* também possui  $\alpha$ -amastinas. E, a partir desse ponto, as amastinas presentes nos *contigs* Tcruzi\_6279 e Tcruzi\_1263 serão denominadas  $\alpha$ 1- e  $\alpha$ 2-amastina, respectivamente.

A identificação destas isoformas em regiões sem predição de genes reflete as falhas que ocorrem durante a predição, o que pode ter subestimado o número de membros de outras famílias multigênicas, ou até mesmo genes de cópia única que não tenham sido atribuídos a cromossomos.



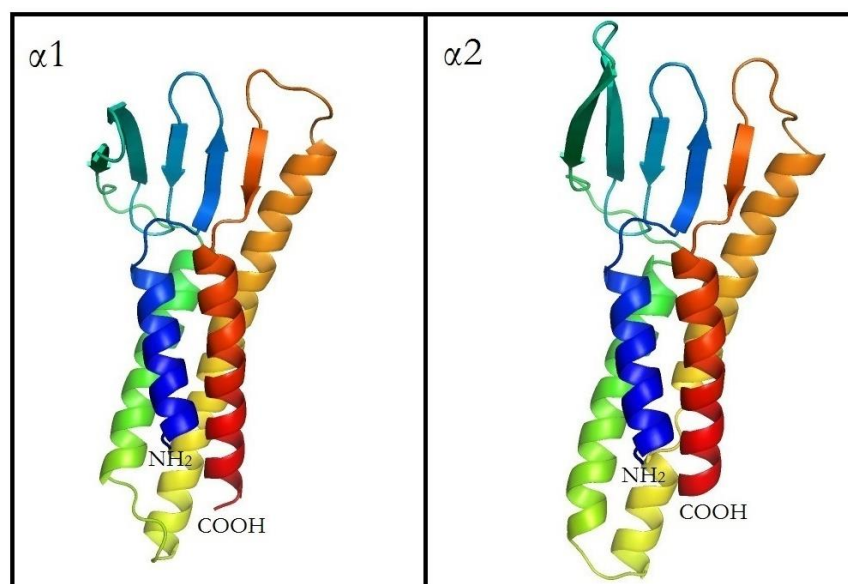
**FIGURA 8. Análise filogenética de membros de diferentes subfamílias de amastinas**

**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA:** A partir do alinhamento originado pelo programa Clustal Omega e que gerou um arquivo multifasta, foi realizada análise filogenética pelo programa Seaview4, que agrupou as amastinas identificadas em *T. cruzi* (em diferentes cepas e clones), *T. brucei*, *Leishmania major*, *L. brasiliensis*,

*L. infantum* e *Crithidia* sp de forma semelhante a verificada na literatura. O *bootstrap* utilizado na análise foi 1000. A imagem ampliada à esquerda mostra as  $\alpha$ -amastinas de diferentes tripanossomatídeos, e destacadas pelas flechas e retângulos verdes estão as regiões codificadoras identificadas nos *contigs* Tcruzi\_6279 e Tcruzi\_12631, que foram aqui classificadas como membros da subfamília das  $\alpha$ -amastinas.

Após classificação destas novas amastinas pela análise filogenética, buscamos a predição de estrutura terciária com o programa Phyre 2 (KELLEY *et al.*, 2015). Na figura 9 estão as análises iniciais das modelagens para cada  $\alpha$ -amastina, são observadas estruturas em folha beta e quatro  $\alpha$ -hélices, coincidindo com as análises de topologia que também sugerem a existência de quatro domínios transmembrana para essas amastinas. Pode ser notado também que a extremidade N-terminal de cada proteína não está modelada, isso porque o programa não encontrou em seu banco de dados homologia nessa região.



Cobertura: 52%

Confiança no modelo: 97,5%

38%

97,7%

**FIGURA 9. Predição de estrutura terciária de  $\alpha$ -amastinas**

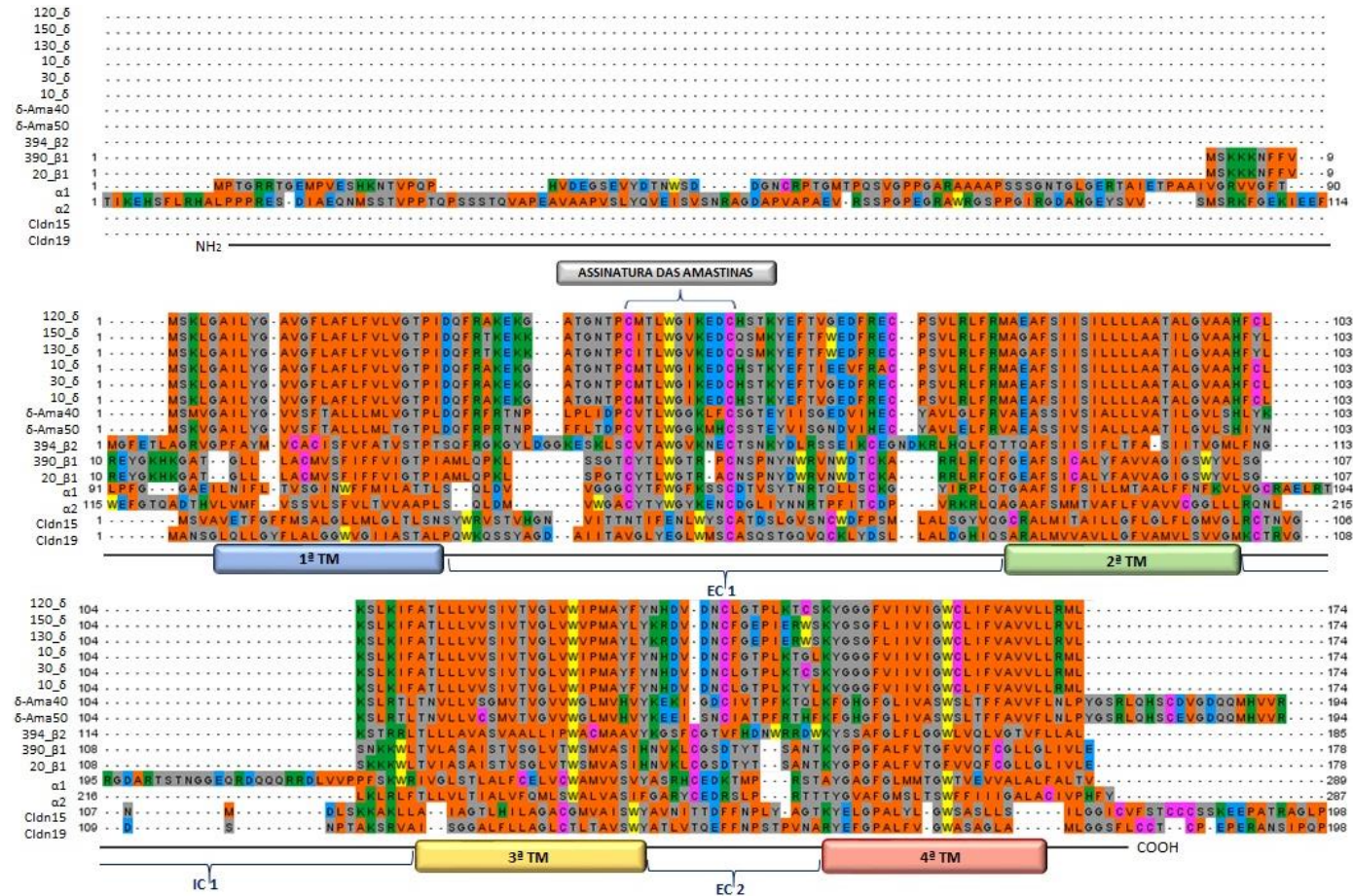
**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA:** A partir da sequência de aminoácidos das amastinas  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2, o programa Phyre 2 realizou as modelagens de estrutura terciária por homologia. Estão representadas estruturas em  $\alpha$ -hélice e folhas  $\beta$ . Por falta de homologia encontrada no bando de dados desde programa, amastina  $\alpha$ 1- teve seu modelamento iniciado no aminoácido 103 e  $\alpha$ 2- no 229, com perda da região N-terminal e de 6 aminoácidos da primeira estrutura em  $\alpha$ -hélice de cada amastina. 151 resíduos de  $\alpha$ 1-amastina (52% da sequência) foram modelados com 97,5% de confiança utilizando um molde (Claudina-19, do aminoácido 11 ao 184) e 146 resíduos de  $\alpha$ 2-amastina (38% da sequência) foram modelados com 97,7% de confiança a partir do molde Claudina-19 (do aminoácido 11 ao 183). Estão indicadas as extremidades amino e carboxiterminais sugeridas pelo programa.

Amastinas de outras subfamílias identificadas anteriormente em *T. cruzi* também apresentam considerável similaridade estrutural com claudinas, assim como já foi demonstrado para as diferentes isoformas presentes em *Leishmania braziliensis* (DE PAIVA *et al.*, 2015; SOUZA-MELO, em andamento). Claudinas são proteínas de uma família multigênica que formam interações com claudinas da mesma célula e de células adjacentes e compõem junções de oclusão em organismos multicelulares, participando da formação de uma barreira no espaço intercelular (que limita a comunicação com células adjacentes nessa região) e também do transporte seletivo de íons e pequenas moléculas (POWELL, 1981; SCHNEEBERGER E LYNCH, 1992). Análises indicam que as duas regiões extracelulares são cruciais na formação das barreiras paracelulares e dos poros para solutos, e acredita-se que também os aminoácidos nelas contidos determinam características de permeabilidade das junções de oclusão (ANGELOW *et al.*, 2008). Claudinas não estão presentes em tripanossomatídeos, mas essas semelhanças estruturais podem sugerir que as funções dessas proteínas possam ser análogas, fornecendo mais informações e abrindo um novo leque de investigação em busca da caracterização funcional de amastinas.

Considerando a similaridade estrutural apontada pelo programa Phyre 2 (KELLEY *et al.*, 2015) foi realizado um alinhamento entre as amastinas de *T. cruzi* (clone CL Brener) e as claudinas citadas como similares (claudina-15 e claudina-19 de *Mus musculus*). Como pode ser visto na figura 10, embora haja similaridade estrutural e conservação do caráter hidrofóbico dos aminoácidos que compõem os domínios transmembrana,  $\alpha$ -amastinas e claudinas diferem bastante nas sequências referentes aos domínios extracelulares. Das amastinas de *T. cruzi*, as  $\delta$ -amastinas apresentam maior conservação de resíduos quando comparadas às claudinas.





**FIGURA 10. Alinhamento entre amastinas de *T. cruzi* e claudinas.**

**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA:** Imagem representativa de alinhamento múltiplo *on line* seguindo Clustal Omega realizado pelo programa Jalview (versão 2.9.0b2). A identificação de cada amastina ou claudina aparece no lado esquerdo e ao lado direito aparece a posição do último aminoácido mostrado em cada linha. A amostra que representa a α2-amastina teve sua sequência iniciada no aminoácido da posição 100, para mostrar as sequências alinhadas. Estão destacadas as posições relativas a cada região transmembrana e domínios extracelulares (EC1 e EC2) e intracelular (IC1). Aminoácidos de caráter hidrofóbico aparecem destacados em laranja, cisteínas aparecem em cor de rosa, triptofano aparece em amarelo, tirosinas, glicinas e treoninas (além de outros aminoácidos) aparecem destacados em cinza. Também está destacada a região referente a sequência conhecida como “assinatura das amastinas”

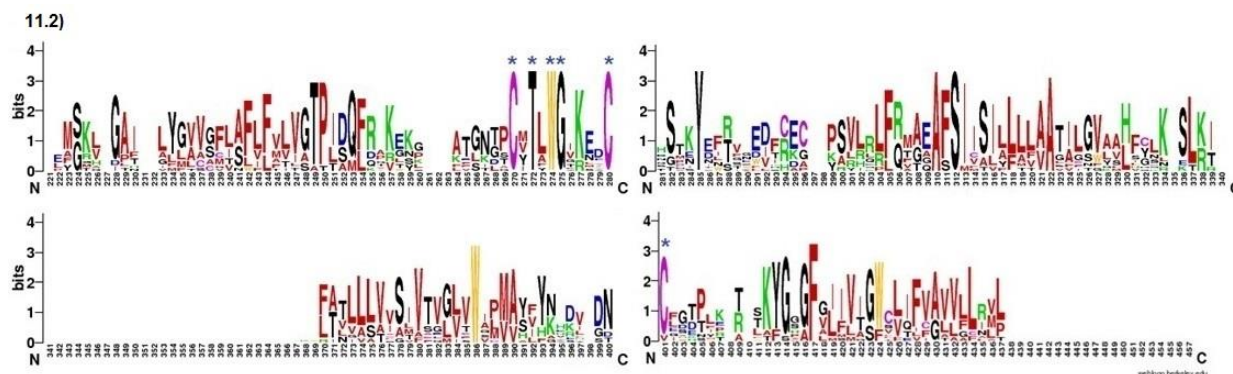
Realizando uma nova análise de aminoácidos, mas agora considerando apenas as amastinas, temos como parte do resultado do alinhamento realizado por Clustal Omega a geração de uma matriz que mostra a porcentagem de identidade das amastinas identificadas até então em CL Brener (FIGURA 11.1). Este resultado é uma análise quantitativa da conservação entre as amastinas, que varia bastante entre subfamílias e até dentro das famílias, como já foi mostrado por Rochete e colaboradores (2005), para *Leishmania* spp e Kangussu-Marcolino et al (2013), para as amastinas identificadas em *T. cruzi* até aquele momento. É importante destacar que a conservação de sequências entre as  $\alpha$ -amastinas de *T. cruzi* é inferior a 30%, o que também ocorre entre outras amastinas de uma mesma subfamília.

Mesmo com a variação na conservação de aminoácidos, verificamos que a “assinatura das amastinas” é mantida nas isoformas encontradas em *T. cruzi*. E, para melhor destacar a conservação de aminoácidos dessa assinatura e também dos resíduos hidrofóbicos que compõem os domínios transmembrana, a figura 11.2 apresenta um Logo, proveniente de alinhamento das amastinas de CL Brener com a ferramenta WebLogo3 (CROOKS *et al.*, 2004). Novamente fica clara a conservação de alguns dos resíduos de cisteína, triptofano e glicina (mantidos em todas as sequências deste alinhamento), que formam a “assinatura das amastinas”.

11.1)

HAPLÓTIPO	IDENTIFICAÇÃO COMPLETA/ABREVIATURA	120_δ	150_δ	130_δ	10_δ	10_δ	30_δ	δAma40	δAma50	390_β1	20_β1	394_β2	α1	α2
Esmeraldo	TcCLB.507739.120_δ	100												
Esmeraldo	TcCLB.507485.150_δ	86	100											
Esmeraldo	TcCLB.507485.130_δ	86	100	100										
Non-Esmeraldo	TcCLB.506437.10_δ	96	85	85	100									
Non-Esmeraldo	TcCLB.509289.10_δ	98	85	85	96	100								
Non-Esmeraldo	TcCLB.506437.30_δ	99	86	86	95	99	100							
Esmeraldo	TcCLB.511071.40_δAma40	49	49	49	51	51	50	100						
Non-Esmeraldo	TcCLB.511903.50_δAma50	51	51	51	51	52	52	88	100					
Esmeraldo	TcCLB.509965.390_β1	27	25	25	26	27	27	22	22	100				
Non-Esmeraldo	TcCLB.509051.20_β1	26	25	25	25	26	27	22	22	98	100			
Esmeraldo	TcCLB.509965.394_β2	31	35	35	31	32	32	29	31	27	27	100		
Contig	TcCLB.6279_α1	21	22	22	21	21	21	21	21	29	29	26	100	
Contig	TcCLB.12631_α2	20	21	21	20	20	20	22	21	30	29	25	29	100





**FIGURA 11. Matriz de identidade entre sequências de aminoácidos de diferentes isoformas de amastinas e Weblogo de amastinas de *T. cruzi***

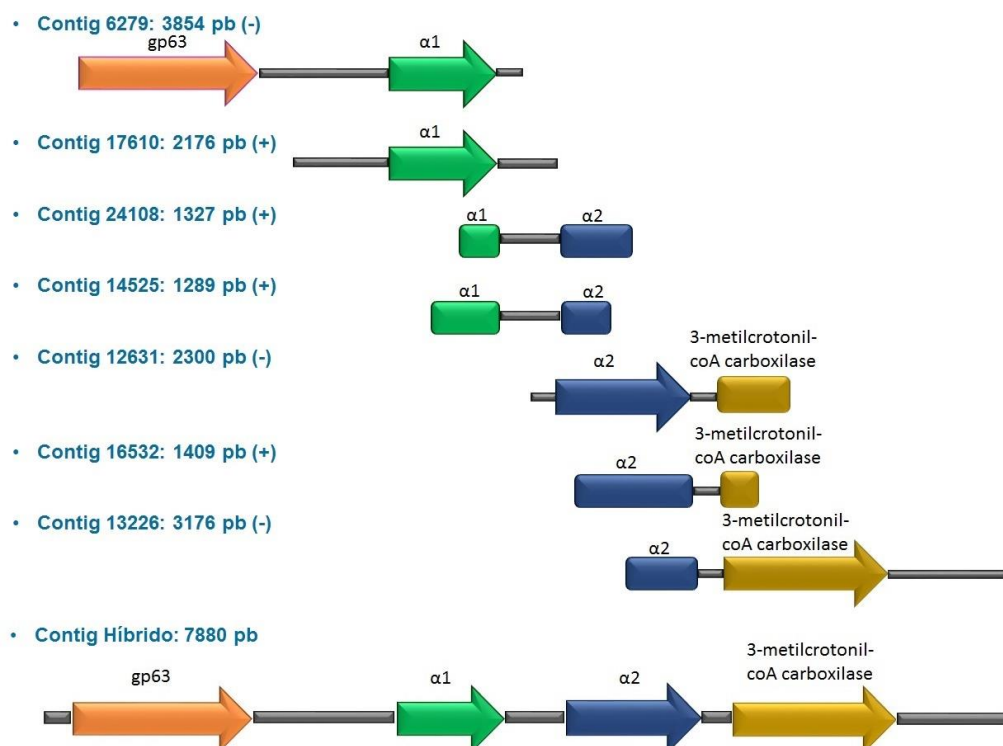
**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA: 11.1)** Matriz de porcentagem de identidade gerada pelo alinhamento com Clustal Omega: a identificação do haplótipo e gene de CL Brener aparece completa à esquerda e abreviada na região superior do quadro; **11.2)** Alinhamento gerado com o programa Clustal Omega submetido ao programa WebLogo a fim de evidenciar o grau de conservação dos aminoácidos das amastinas. Devido a diferença no número de aminoácidos que constituem as isoformas destas proteínas, o alinhamento inicia na posição 221 para destacar as regiões de alinhamento mais importantes. O tamanho das letras representa a variação na composição de cada posição. Os asteriscos azuis destacam os resíduos de aminoácidos mais conservados e pertencentes à “assinatura das amastinas”.

## 6.2 ARRANJO GENÔMICO DE $\alpha$ -AMASTINAS EM *T. cruzi*

Uma vez que as sequências das prováveis  $\alpha$ -amastinas foram encontradas em regiões não montadas do genoma, não é possível determinar de forma acurada seu número de cópias, nem o cromossomo onde elas estão localizadas por análises *in silico*. A fim de iniciar a caracterização genômica destes genes foram realizados ensaios de RFLP (Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição) e PFGE (Gel de Eletroforese em Campo Pulsado) seguido de *Southern blot*, utilizando DNA genômico de diferentes cepas e clones.

De acordo com o observado por Jackson (2010) em *Crithidia* sp. e Leishmanias,  $\alpha$ -amastinas estão organizadas em *tandem* (em sequência, tradução livre) no genoma, e um forte indício de que isso ocorra em *T. cruzi* é a detecção de 2 *contigs* (Tcruzi\_24108 e Tcruzi\_14525) que apresentam fragmentos de ambas  $\alpha$ -amastinas. A partir dos *contigs* obtidos (por pesquisas em *tblastn*) que apresentam regiões codificadoras completas ou parte das sequências de  $\alpha$ -amastinas, foram realizadas fusões e sobreposições, dando origem a um *contig* quimérico de 7880 nucleotídeos, proveniente da sobreposição dos *contigs* Tcruzi\_6279, Tcruzi\_17610, Tcruzi\_24108, Tcruzi\_14525, Tcruzi\_12631, Tcruzi\_16532 e Tcruzi\_13226 do clone CL Brener (FIGURA 12).



**FIGURA 12.** Esquema representativo dos *contigs* que codificam  $\alpha$ -amastinas de *T. cruzi* (clone CL Brener) e montagem de *contig* quimérico.

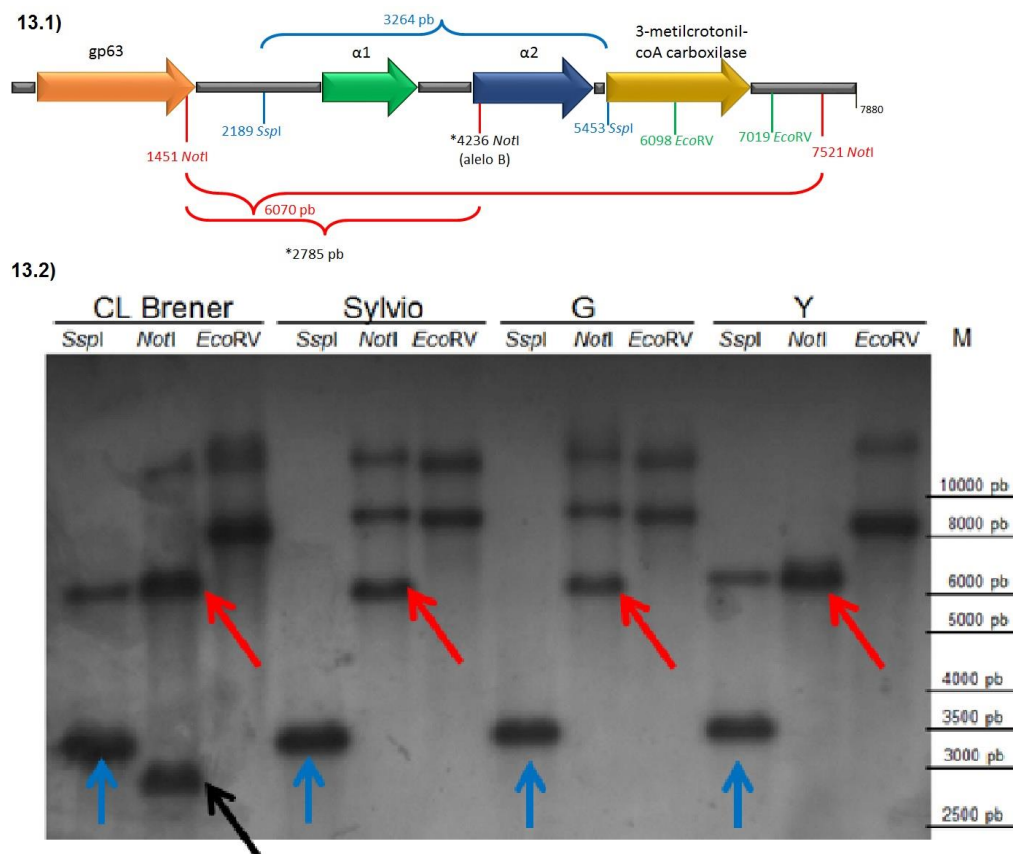
**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA:** A partir dos *contigs* que contêm sequências completas ou fragmentos de cada  $\alpha$ -amastina foram realizadas sobreposições que deram origem a um contig quimérico que mostra uma hipótese de arranjo genômico desses genes e dos que os flanqueiam. Acima de cada esquema está a identificação do contig e sua orientação, podendo ser da fita positiva (+) ou negativa (-).

Baseado no mapa de restrição teórico desse *contig* quimérico (FIGURA 13.1), foram escolhidas enzimas de restrição que clivassem em regiões que flaqueiam as codificadoras das  $\alpha$ -amastinas, para avaliar o arranjo genômico de tais genes. Após a digestão, eletroforese e transferência do DNA, a membrana foi hibridizada com sonda da região codificadora de  $\alpha$ 1-amastina amplificada por PCR e marcada radioativamente com d-CTP[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] (Figura 13.2).

Inicialmente, os fragmentos esperados para digestão com *NotI* e *SspI*, e hibridação eram ~6070 e ~3264 pb, respectivamente; para a digestão com *EcoRV*, não havia um tamanho teórico esperado, já que o trecho analisado continha apenas um sítio para esta enzima de restrição. Para todas as cepas e clones analisados foram encontradas bandas nos tamanhos esperados, contudo em alguns casos bandas adicionais foram detectadas. Para o clone CL Brener uma análise mais cuidadosa da sequência de nucleotídeos dos *contigs* apontou a provável existência de alelo polimórfico para o sítio de *NotI*, o que explicaria a banda adicional de ~2785 pb. Esta variação de alelos no clone CL Brener é justificada pelo caráter híbrido deste clone pertencente ao grupo TcruziVI (EL-SAYED *et al.*, 2005a, ZINGALES *et al.*, 2009). O aparecimento das bandas adicionais em outras digestões

pode ser explicado por uma potencial presença de múltiplas cópias no genoma ou pela ocorrência de restrição parcial. De forma geral, cabe destacar que os DNAs dos diferentes *T. cruzi* sugerem uma organização cromossômica semelhante.



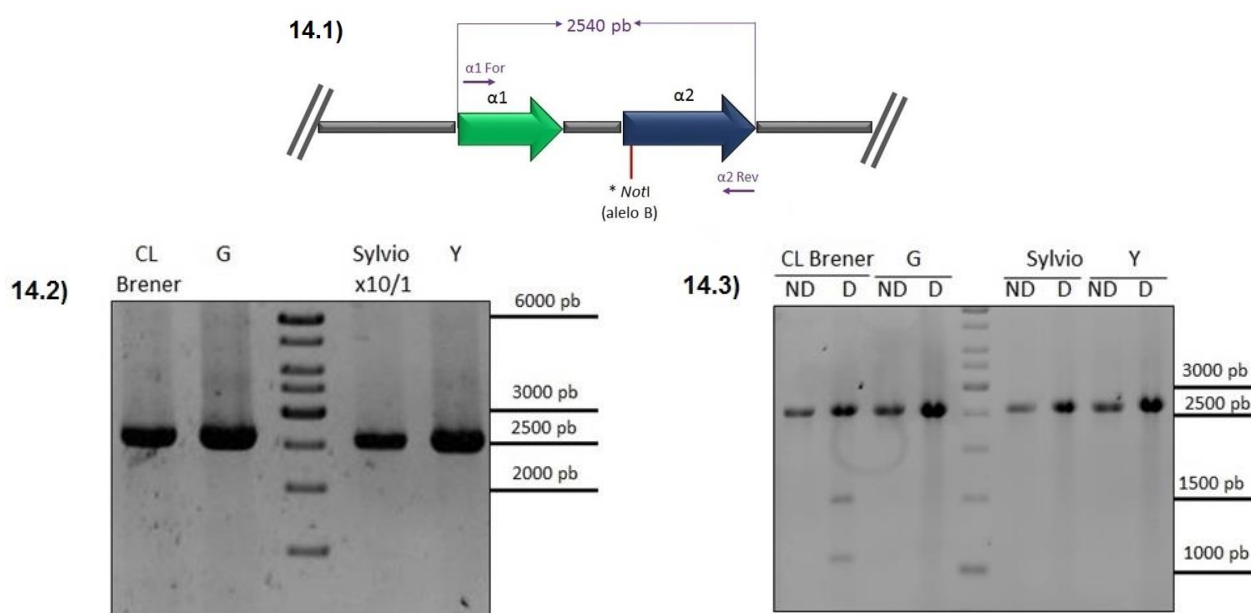
**FIGURA 13.** Mapa de restrição de um *contig* quimérico de *T. cruzi* e ensaio de polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RLFP) de DNA genômico de clones e cepas selvagens de *T. cruzi* para verificação do arranjo genômico de  $\alpha 1$ -amastina  
**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA: 13.1)** O esquema mostra a montagem de um *contig* a partir de sequências obtidas do genoma de CL Brener de regiões não montadas em cromossomos. A região codificadora de  $\alpha 1$ -amastina está representada como seta verde e de  $\alpha 2$ -amastina em seta azul. Os sítios de restrição escolhidos para o ensaio de RFLP, mostrados em seguida, estão indicados com suas respectivas posições no *cluster* analisado; **13.2)** O DNA genômico dos clones CL Brener e Sylvio X10/1, cepas G e Y foi digerido, em reações individuais, com as enzimas SspI, NotI e EcoRV. Após corrida de eletroforese, o gel foi tratado, transferido para membrana e hibridizado com sonda de  $\alpha 1$ -amastina marcada radioativamente (dCTP [ $\alpha 32$ P]).

Como mencionado anteriormente, foi observado que em *Crithidia* sp. e Leishmanias as  $\alpha$ -amastinas aparecem em sequência (JACKSON, 2010), para verificar se o mesmo ocorre em *T. cruzi*, além do RFLP foram realizadas amplificações por PCR, utilizando DNA genômico de diferentes clones e cepas e os oligonucleotídeos iniciadores que amplificam a sequência codificadora de cada  $\alpha$ -amastina, nesse caso o par usado foi  $\alpha 1\_F$  e  $\alpha 2\_R$ , visando amplificar desde o início de  $\alpha 1$ -amastina até o final de  $\alpha 2$ -amastina.

A partir do *contig* quimérico foi estimado um produto de amplificação de aproximadamente 2500 pares de base, compreendendo  $\alpha$ 1-amastina, uma região intergênica e  $\alpha$ 2-amastina. Como pode ser visto na figura 14.2, para os quatro DNAs genômicos amplificados por PCR houve detecção de banda no tamanho esperado, o que é mais um indício de que, assim como nos outros tripanossomatídeos, as  $\alpha$ -amastinas de *T. cruzi* estão organizadas em sequência no genoma deste organismo.

Com intuito de ratificar a montagem desse *contig*, todos os produtos de amplificação foram digeridos com a enzima *NotI*. Na figura 14.3 pode ser vista a imagem de gel de agarose que evidencia a clivagem e detecção de bandas apenas para CL Brener, que em um de seus alelos possui um sítio para essa enzima. A intensidade das bandas liberadas em CL Brener é outro indício de que o sítio de *NotI* está presente em apenas um dos alelos. Para as demais linhagens analisadas não houve clivagem e os perfis de eletroforese das amostras não digeridas (ND) e digeridas (D) são similares.

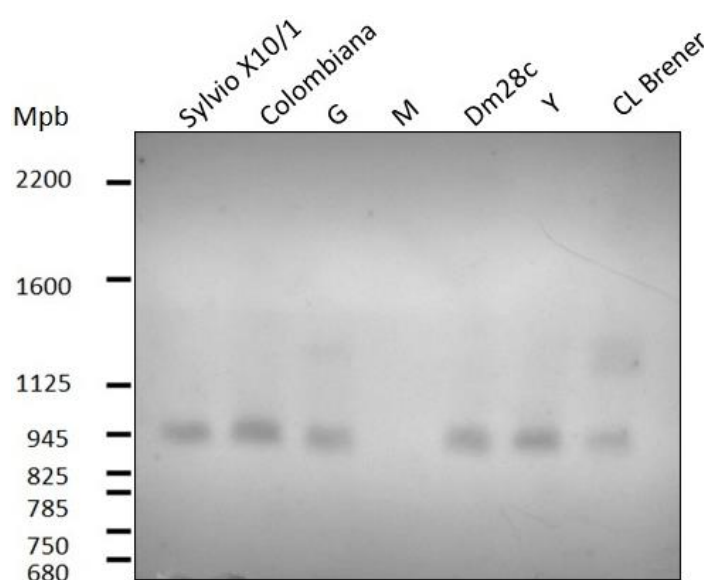


**FIGURA 14. Esquema teórico de organização genômica de  $\alpha$ -amastinas em *Trypanosoma cruzi*, amplificações e digestões de DNA genômico de clones e cepas selvagens do parasito para verificação desta organização**

**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA: 14.1)** O esquema mostra o arranjo genômico teórico de  $\alpha$ -amastinas (como em 13.1), porém agora evidenciando apenas estes genes e o tamanho esperado do fragmento amplificado pelos *primers*  $\alpha$ 1-For e  $\alpha$ 2-Rev, além do sítio de restrição para *NotI*; **14.2)** Imagem de gel de agarose 1% após eletroforese das amplificações de DNA genômico de CL Brener, cepa G, clone Sylvio X10/1 e cepa Y com os iniciadores citados anteriormente. O tamanho do fragmento para cada amostra está de acordo com o esperado (cerca de 2500 pb); **14.3)** Os produtos de amplificação foram submetidos a restrição enzimática com *NotI* e o perfil de restrição está mostrado nesta imagem de gel de agarose 1% onde se vê amostras não digeridas (ND) e digeridas (D).

Como já mencionado, as  $\alpha$ -amastinas estão em regiões não montadas em cromossomos de CL Brener, o que impossibilita determinar *in silico* em que cromossomo estes genes estão localizados. Em busca da localização *in vitro*, foi realizada uma PFGE, que separou em bandas cromossômicas o DNA de diferentes cepas e clones de *T. cruzi*. Após corrida de eletroforese e tratamento do gel, as amostras foram transferidas para membrana de *nylon* positivamente carregada e esta membrana foi hibridizada com sonda correspondente a região codificadora de  $\alpha$ 1-amastina marcada radioativamente com d-CTP[ $\alpha$ -32P]. Pode ser observado na figura 15 que todas as cepas e clones apresentaram sinal mais forte com aproximadamente o mesmo tamanho, o que confirma a presença do gene em um cromossomo de ~945 Mpb. Cabe ressaltar que este cromossomo é de tamanho diferente do encontrado para as outras amastinas (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013), e que diferentemente das  $\delta$ -amastinas, as  $\alpha$ -amastinas estão localizadas em uma única banda cromossômica.



**FIGURA 15. Localização genômica de  $\alpha$ 1-amastina em diferentes clones e cepas de *T. cruzi*.**

**FONTE: O autor (2016)**

**NOTA:** Bandas cromossômicas de distintos clones e cepas de *T. cruzi* obtidas por gel de eletroforese em campo pulso (PFGE), transferidas para membrana e hibridizadas com sonda contendo a região codificadora de  $\alpha$ 1-amastina marcada com dCTP [ $\alpha$ -32P].

### 6.3 DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE $\alpha$ -AMASTINAS EM *Trypanosoma cruzi*

Em análises realizadas anteriormente, foi demonstrado que o nível de expressão das classes de amastinas em *T. cruzi* varia entre algumas cepas, fases do ciclo celular e também

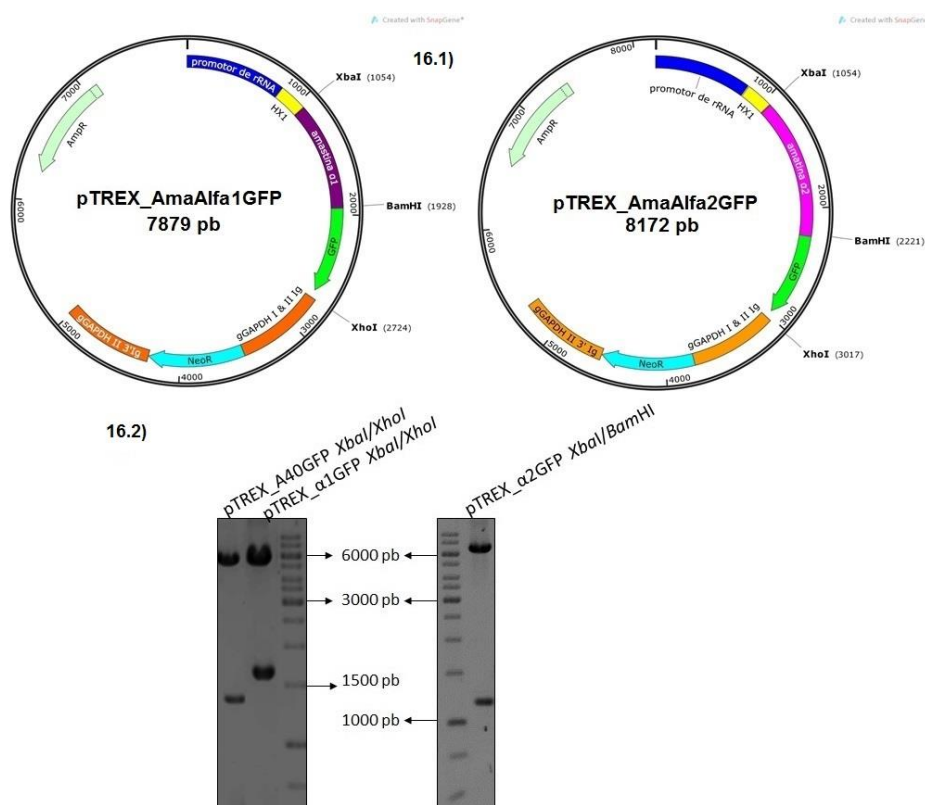
entre as isoformas, diferentemente do que ocorre em espécies de *Leishmania* spp, que apresentam amastinas das quatro subfamílias com expressão aumentada na forma amastigota (WU *et al.*, 2000; KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013; DE PAIVA *et al.*, 2015). Em *T. cruzi*,  $\delta$ -amastinas tendem a ter o nível de expressão mais alto em amastigotas e  $\beta$ -amastinas em epimastigotas. Além disso, para  $\beta$ -amastina foram detectados transcritos de tamanhos distintos em CL Brener, o que pode indicar que houve processamento alternativo de mRNA ou mesmo divergência entre alelos (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

Outro ponto a ser avaliado é a localização subcelular das  $\alpha$ -amastinas em *T. cruzi*, considerando que apesar de compartilharem a mesma topologia de quatro regiões transmembrana, as outras amastinas já identificadas neste organismo apresentam diferenças no padrão de localização subcelular, o que pode indicar até diferentes funções para estas isoformas (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

Para expressar as  $\alpha$ -amastinas fusionadas a GFP, foram contruídos vetores a partir do vetor integrativo pTREX-n (VAZQUEZ e LEVIN, 1999), que apresenta intercodificadoras de gGAPDH, promotor do *locus* de rRNA e HX1 (parte do gene TcP2 $\beta$ , que codifica para uma proteína ribossomal em *T. cruzi*), que funciona como região para *trans-splicing* próximo ao sítio de policlonagem, sendo essas regiões importantes para estabilização do transcrito de interesse e facilitando sua expressão. Os vetores contêm também GFP, que foi utilizada na fusão e sequência que confere resistência ao antibiótico G418, para a seleção de parasitos transfectados.

Foram realizadas amplificações por PCR da região codificadora de cada  $\alpha$ -amastina e clonagem destes fragmentos no vetor comercial pTZ57R/T (Life Technologies). Após confirmação desta clonagem foram realizadas digestões enzimáticas para a ligação da codificadora das  $\alpha$ -amastinas ao vetor pTREX-GFP (VAZQUEZ e LEVIN, 1999; DaROCHA *et al.*, 2004b). Neste caso foi utilizado o vetor pTREXAma40GFP (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013), que foi digerido com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI para retirada da amastina Ama-40 e posterior ligação de cada codificadora de  $\alpha$ -amastina (FIGURA 16).





**FIGURA 16. Desenho esquemático de vetores pTREX\_Ama $\alpha$ 1GFP E pTREX\_Ama $\alpha$ 2GFP e diagnóstico de sua construção**

**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA: 16.1)** Representação esquemática de vetores construídos para expressão de cada  $\alpha$ -amastina fusionada a GFP, evidenciando as enzimas e sítios de restrição utilizados durante as clonagens;

**16.2)** Géis de agarose 1% para diagnóstico de clonagem dos vetores pTREXama\_ $\alpha$ 1GFP (evidenciando a diferença do perfil do vetor de início pTREX\_Ama40GFP) com as enzimas XbaI/XhoI e pTREXama\_ $\alpha$ 2GFP com XbaI/BamHI. Os fragmentos gerados pela restrição estão de acordo com o esperado.

Tendo confirmado as clonagens, os vetores foram transfectados em epimastigotas de CL Brener e cepa G, para analisar as possíveis diferenças entre as expressões em representante de DTU I (cepa G) e de DTU VI (CL Brener). Como foi verificado por citometria de fluxo que as populações de cepa G transfectadas não estavam com porcentagem de parasitos fluorescentes maior que 90% (considerada o mínimo ideal para este trabalho), foram realizadas clonagens por diluição seriada, a fim de obter populações mais homogêneas expressando cada  $\alpha$ -amastina fusionada a GFP. Até este momento não foram obtidos clones de CL Brener expressando as fusões.

Imagens de parasitos fluorescentes foram captadas por microscopia confocal de culturas de cepa G e do clone CL Brener (FIGURA 17). Epimastigotas cepa G e CL Brener contendo o vetor pTREX-GFP também foram utilizados nas análises e, como esperado, quando apenas GFP está expressa, ela aparece em todo o citoplasma (FIGURA 17 A-C). Já a fusão  $\alpha$ 1::GFP aparece dispersa pelo citoplasma, sendo também observada marcação perinuclear em parasitos transfectados clone CL Brener (FIGURA 17 D-F) e cepa G (FIGURA 17 J-L). A fusão de  $\alpha$ 2-amastina a GFP, em ambas as linhagens transfectadas (CL Brener,

FIGURA 17 G-I e G, FIGURA 17 M-O), foi localizada em regiões pontuais no citoplasma dos parasitos, que podem pertencer a membranas de organelas esféricas ou estar associadas a vesículas intracelulares. Cabe ressaltar que também foi observado forte sinal fluorescente tanto de  $\alpha 1::GFP$  quanto de  $\alpha 2::GFP$  próximo ao cinetoplasto e bolsa flagelar.

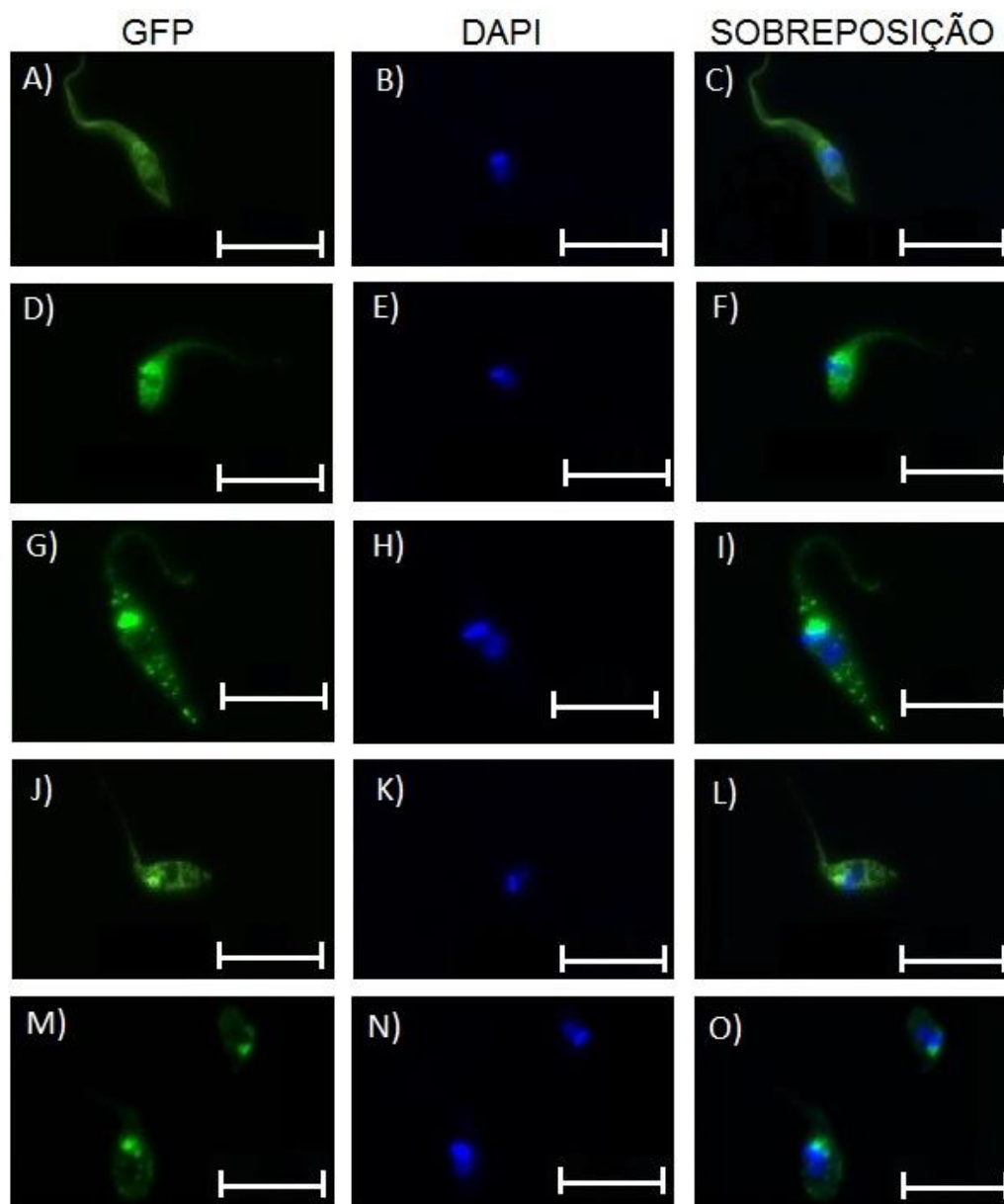
Através de ensaios e análises de imagens obtidas por microscopia confocal, diferentes classes de amastinas ( $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) já foram localizadas também na superfície celular de *L. infantum*, *L. major* e *L. brasiliensis* e em organela próxima a bolsa flagelar. E, diferente do encontrado para *T. cruzi*, quando utilizadas fusões com GFP não foi possível verificar sinal na região do flagelo desses organismos (ROCHETE *et al.*, 2005; DE PAIVA *et al.*, 2015).

Quanto à localização das outras amastinas já identificadas em *T. cruzi* (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013) a partir da transfecção de vetores para expressão de cada amastina fusionada a GFP, foi verificado que  $\beta 1$ - e  $\delta$ -amastinas também aparecem na superfície da célula (porém sem sinal perinuclear, como visto para  $\alpha 1$ );  $\beta 2::GFP$  está dispersa no citoplasma e  $\delta$ -Ama40, similar a  $\alpha 2$ -amastina, aparece em regiões pontuais do citoplasma. Ainda não foi possível estabelecer a localização organelar de  $\delta$ -Ama40, já que as tentativas de co-localização com anticorpos marcados não foram bem-sucedidas (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

Para obtenção de mais dados sobre a localização das  $\alpha$ -amastinas em *T. cruzi* é necessária a realização de experimentos como fracionamento celular e microscopia eletrônica, além de ensaios de co-localização. Cabe ressaltar que já testamos alguns anticorpos em ensaios de co-localização em nosso laboratório sem sucesso nas marcações esperadas.

Para verificar se o perfil de migração em gel de poliacrilamida das  $\alpha$ -amastinas fusionadas a GFP está de acordo com o esperado, foram realizadas extrações de proteína total de epimastigotas de cepa G e clone CL Brener do tipo selvagem, transfectados com o vetor de expressão de GFP e também com os vetores contendo cada  $\alpha$ -amastina fusionada a GFP. Amostras desses quatro extratos foram tratadas com o agente redutor DTT (ditiotreitól), separadas em géis de SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana, para realização de *Western blot* com anticorpos anti-GFP e anti- $\alpha$ -tubulina (FIGURA 18).





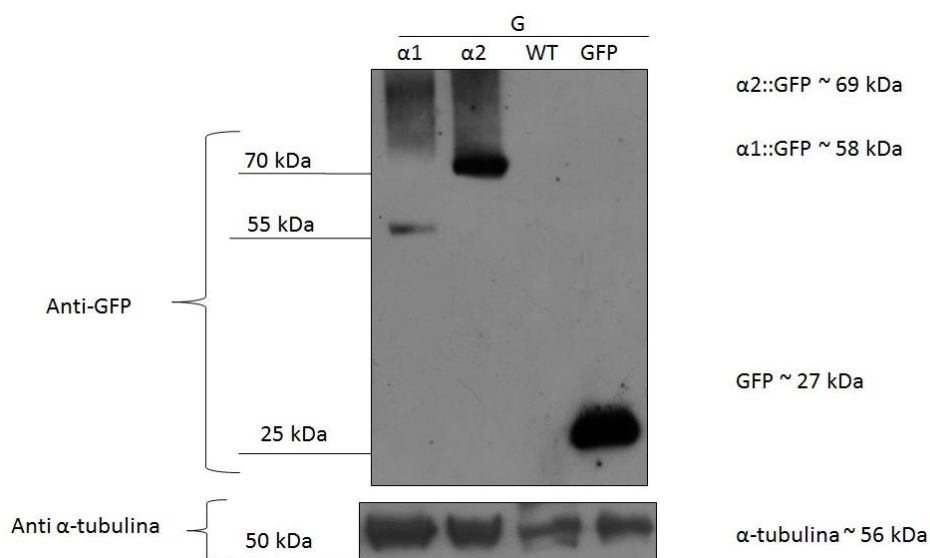
**FIGURA 17. Localização de  $\alpha$ -amastinas fusionadas a GFP em *T. cruzi***

**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA:** Imagens de parasitos epimastigotas do clone CL Brener ou cepa G expressando proteínas fucionadas a GFP de maneira estável. As imagens foram obtidas por microscopia confocal utilizando lente objetiva de 60x e zoom digital de 2x. Os painéis A-I mostram parasitos clone CL Brener, sendo que em A-C vem de parasitos transfectados com vetor para expressão somente de GFP; D-F evidencia um indivíduo da população que expressa a fusão  $\alpha 1::GFP$  e G-I são imagens de um parasito que expressa a fusão  $\alpha 2::GFP$ . Painéis J-O mostram parasitos da cepa G: J-L correspondem a fusão  $\alpha 1::GFP$  e M-O mostra indivíduos transfectados com vetor para expressão da fusão  $\alpha 2::GFP$ . Imagens obtidas com o filtro para captação de GFP estão nos painéis A, D, G, J e M; as marcações com DAPI podem ser individualmente vistas nos painéis B, E, H, K, e N e as sobreposições das duas imagens de cada amostra estão nos painéis C, F, I, L e O. A barra corresponde a 10  $\mu m$ .

Quando utilizado o anticorpo anti-GFP foi possível verificar que a banda referente a GFP está de acordo com seu tamanho esperado (~27 kDa), e as fusões  $\alpha 1::GFP$  e  $\alpha 2::GFP$  provenientes da cepa G também, já que aparecem sinais mais fortes entre as bandas de 55 e 70 kDa, o que sugere que não há modificação pós-traducional nas  $\alpha$ -amastinas

(considerando o pesos moleculares esperados para  $\alpha 1$  de ~31,2 kDa e de ~58,2 para  $\alpha 1::GFP$  e de ~42 kDa para  $\alpha 2$  e ~69 kDa para  $\alpha 2::GFP$ ). E, embora tenha sido possível obter imagens de microscopia de fluorescência (imagens não mostradas) e confocal, não foi possível verificar sinal das fusões  $\alpha 1::GFP$  e  $\alpha 2::GFP$  provenientes do clone CL Brener quando a membrana foi tratada com anticorpo anti-GFP. Como controle qualitativo do experimento foi utilizado anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina (proteína de expressão constitutiva em *T. cruzi*).



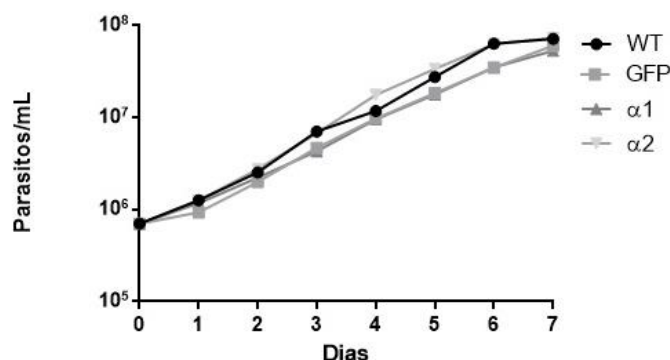
**FIGURA 18. Western blot de extrato total de parasitos epimastigotas cepa G e CL Brener do tipo selvagem e transfectados**

**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA:** Imunoblot de extratos proteicos totais de epimastigotas expressando cada  $\alpha$ -amastina fusionada a GFP no clone CL Brener e na cepa G; dessa cepa também são mostrados extratos de parasitos do tipo selvagem (WT) e que expressam somente GFP (GFP). Os anticorpos utilizados são anti-GFP (quadro superior) e anti- $\alpha$ -tubulina (quadro inferior). Os números à esquerda representam os pesos moleculares do marcador.

Como é conhecido que a “superexpressão” de proteínas endógenas pode afetar de alguma maneira o fenótipo dos parasitos (PEREIRA *et al.*, 2003; SCHOLJET *et al.*, 2011; CRUZ *et al.*, 2012), é importante realizar a avaliação desses possíveis efeitos. Como primeiro esforço, demos início a avaliação da taxa de crescimento de parasitos tipo selvagem e transfectados com os vetores para expressão de GFP e das fusões de cada  $\alpha$ -amastina na cepa G (na qual foi confirmada a expressão das fusões) (FIGURA 19).

Esse ensaio precisa ser realizado em triplicata e com avaliação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo, mas como resultado preliminar não se vê diferença significativa entre as amostras analisadas, como já foi mostrado para a cepa G quando uma  $\delta$ -amastina foi expressa fusionada a GFP (CRUZ *et al.*, 2012).



**FIGURA 19. Avaliação do efeito da expressão de  $\alpha$ -amastinas no crescimento de epimastigotas cepa G transfetadas**

**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA:** A identificação de cada amostra aparece à direita, o número de parasitos é representado no eixo Y e o tempo de contagem no eixo X. Além da cepa G selvagem, os clones obtidos das populações transfetadas com pTREXnGFP, para expressão de GFP fusionada ou não com as  $\alpha$ -amastinas foram inoculados a  $0,5 \times 10^6$  parasitos/mL e o crescimento foi acompanhado diariamente por contagem em câmara de Neubauer. A plotagem do gráfico foi realizada pelo programa GraphPad Prism 6.

#### 6.4 CARACTERIZAÇÃO DE $\beta$ -AMASTINAS DE *Trypanosoma cruzi* POR MEIO DE SUA DELEÇÃO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

Em estudos de genômica funcional, o bloqueio da expressão de um gene e sua complementação podem fornecer importantes informações. O nocaute de genes por recombinação homóloga ou seu silenciamento utilizando RNAi são amplamente utilizadas em pesquisas para vários organismos, incluindo os tripanossomatídeos *Trypanosoma brucei* e *Leishmania brasiliensis* (NGÔ *et al.*, 1998; SHI *et al.*, 2000; LYE *et al.*, 2010). Porém, assim como *L. major* e *L. donovani*, *T. cruzi* não apresenta maquinaria funcional de RNAi, o que até 2014 (quando publicados resultados do desenvolvimento de técnicas para nocaute aplicadas a *T. cruzi*, como os sistemas DiCre e CRISPR-Cas9) restringia os estudos de nocaute de genes à utilização de deleção por recombinação homóloga, utilizada com mais sucesso para diferentes genes (que não são de famílias multicópias) (COOPER *et al.*, 1993; DaROCHA *et al.*, 2004a; EL-SAYED *et al.*, 2005a; MACRAE *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2010; KOLEV *et al.*, 2011; PENG *et al.*, 2014; KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2015).

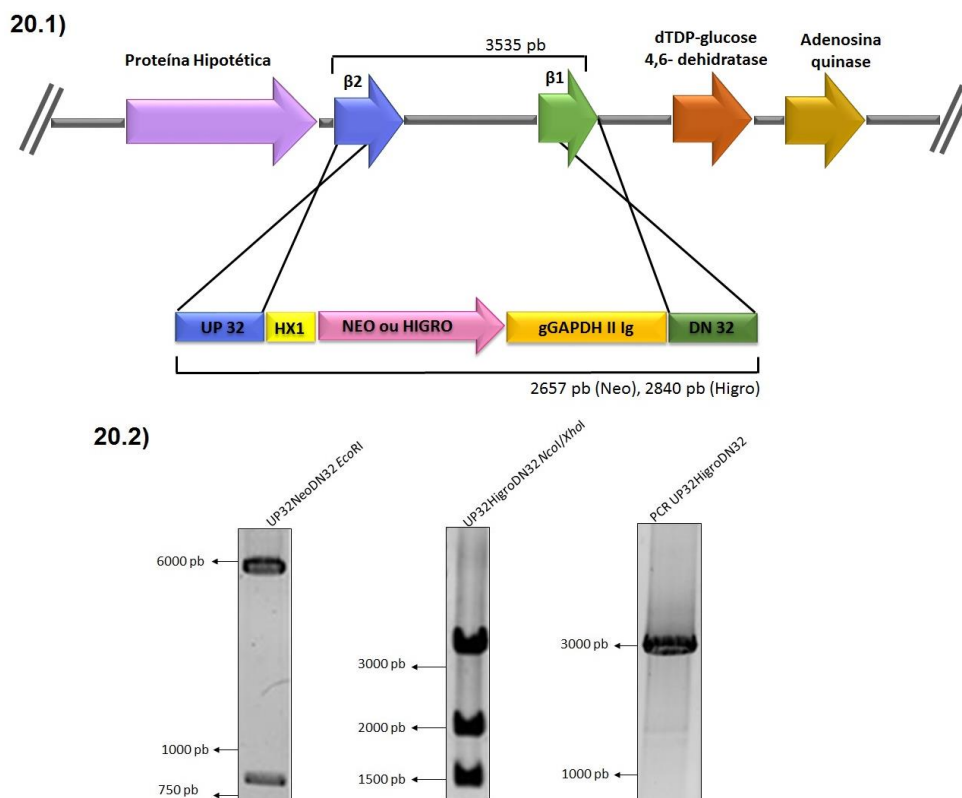
As  $\beta$ -amastinas de *T. cruzi* são mais expressas em formas epimastigotas do parasito e estão em cópia única no genoma de CL Brener (como verificado por análises de cobertura gênica em dados de sequenciamento e montagem do genoma) (WEATHERLY *et al.*, 2009; JACKSON, 2010; KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013). Esta estrutura genômica parece estar conservada em tripanossomatídeos. A fim de caracterizar funcionalmente este grupo

de amastinas foi desenvolvida estratégia de deleção por recombinação homóloga para essas isoformas de amastinas, que aparecem em sequência no genoma.

Como mencionado na metodologia, com base nos dados de genoma do clone CL Brener foram desenhados iniciadores para amplificação (e inclusão de sítios de restrição) de regiões nomeadas neste trabalho como UP32 e DN32. Tais regiões correspondem as porções das regiões codificadoras das  $\beta$ -amastinas e quando recombinadas no genoma do parasito acarretarão na interrupção destes genes. Nessa estratégia será interrompida a expressão das  $\beta$ -amastinas sem prejudicar as proteínas adjacentes.

Após amplificação de UP32 e DN32 foram realizadas (individualmente) ligações destes fragmentos ao vetor comercial pTZ57R/T (Life Technologies) que foi posteriormente digerido com as enzimas cujos sítios de restrição foram adicionados pelos iniciadores (dados não mostrados). Estes fragmentos foram então ligados aos vetores pUPNeoDN e pUPHigroDN que foram digeridos com as mesmas enzimas antes da ligação, dessa forma construindo os vetores pUP32NeoDN32 e pUP32HigroDN32. Estes vetores contêm, além das regiões anteriormente mencionadas (UP32 e DN32), parte da região 5' não traduzida (UTR) da proteína ribossômica TcP2 $\beta$  (HX1) e da região 3' UTR de GAPDH, que flanqueiam os genes de resistência a Neomicina e Higromicina auxiliando na expressão (FIGURA 20).

O DNA destes vetores foi obtido em maior quantidade e as regiões que compreendem desde o início de UP32 ao fim de DN32 de cada cassete para recombinação foram amplificados por PCR com os iniciadores anteriormente utilizados. O produto de amplificação foi digerido com *DpnI* para eliminação do DNA molde (evitando possível contaminação com o vetor íntegro durante a transfecção) e depois o cassete contendo gene de resistência a Neomicina foi transfectado por eletroporação em formas epimastigotas do clone CL Brener. Após o período de seleção (cerca de 20 dias), as populações resistentes ao antibiótico foram clonadas por diluição limitante.

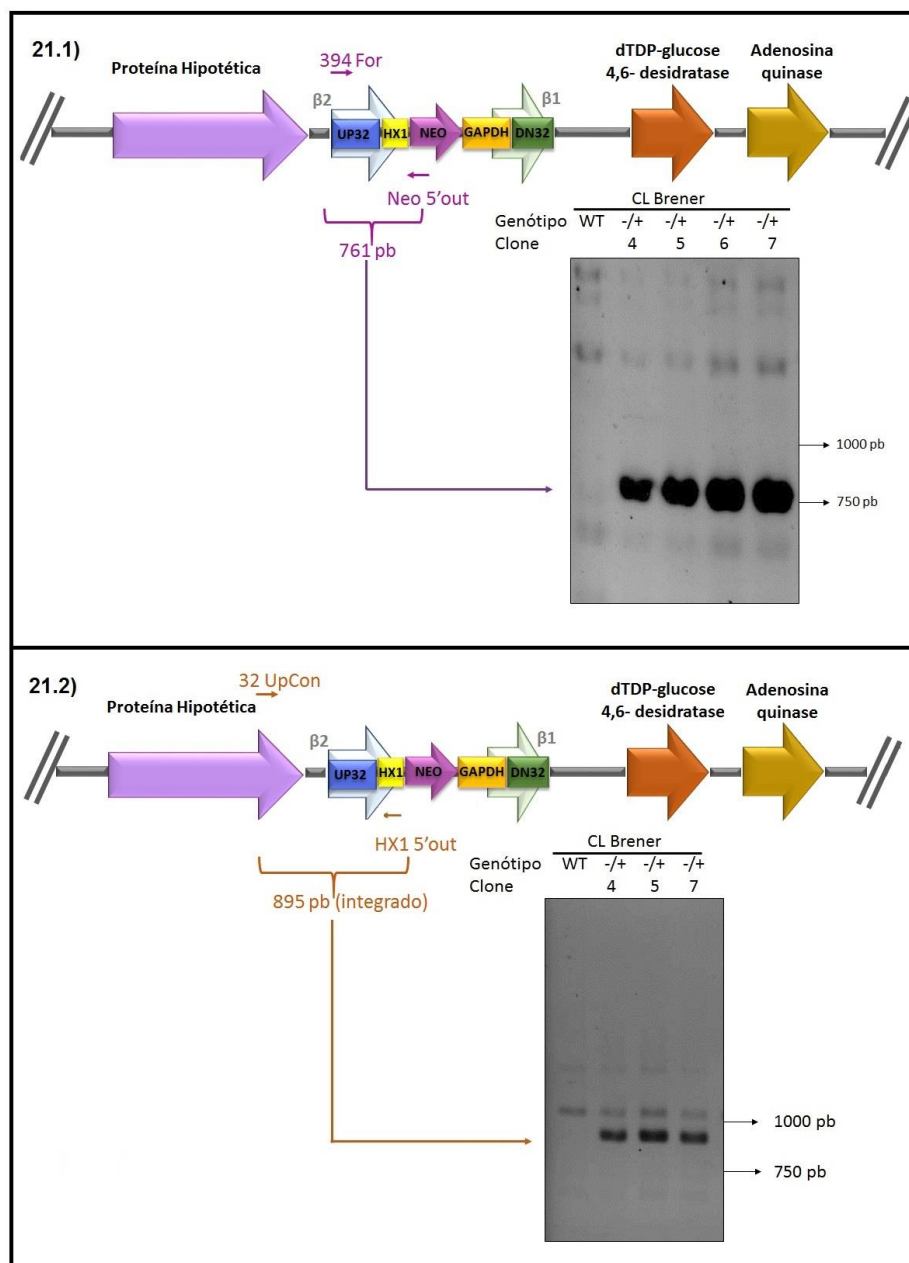


**FIGURA 20. Esquema representativo da estratégia para deleção por recombinação homóloga das  $\beta$ -amastinas de *Trypanosoma cruzi* e confirmação da construção dos vetores e preparação do cassete**

**FONTE:** O autor (2016)

**NOTA: 20.1)** O esquema evidencia a região do cromossomo 32 do genoma do clone CL Brener onde estão localizadas as sequências codificadoras para as  $\beta$ -amastinas. Para a construção dos cassetes foram amplificadas por PCR as regiões UP32 e DN32 que foram clonadas em vetores pUPNeoDN e pUPHigoDN. O DNA dos vetores pUP32NeoDN32 e pUP32HigoDN32 foi então amplificado com os iniciadores correspondentes ao início e final de cada cassete e utilizado em transfeções; **20.2)** A construção dos vetores foi confirmada por restriões enzimáticas de pUP32NeoDN32 com *EcoRI* (com liberação de bandas de 5638 pb e 838 pb) e pUP32HigoDN32 com *NcoI/XhoI* (com liberação de bandas de 3618 pb, 1928 pb e 1438 pb) e a amplificação por PCR de um dos cassetes (UP32HigoDN32) está mostrada à direita. As imagens de géis de agarose 1% indicam que os perfis estão de acordo com o esperado.

Para detectar se o primeiro cassete de deleção havia sido transfectado de forma estável e se estava integrado na região genômica correta de CL Brener, foram realizadas extrações de DNA genômico e amplificações por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores que anelam em regiões do cassete e também do genoma do parasito (FIGURA 21). Como esperado, houve amplificação apenas do segmento de interesse quando utilizado DNA dos clones resistentes, mas não do parasito selvagem (WT), confirmando então a transfecção estável e integração do primeiro cassete de deleção em um dos alelos. Não comprovamos a inserção por *Southern blot* devido a dificuldade de obtenção de nucleotídeos radiomarcados e pela baixa capacidade de detecção quando utilizamos kit de marcação não radioativo.



**FIGURA 21. Diagnóstico de entrada e integração do cassete UP32NEODN32 em CL Brener**

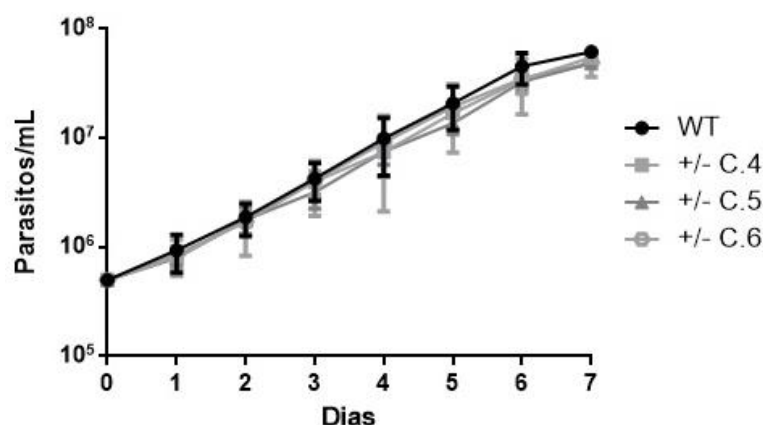
**FONTE:** O autor (2016)

**NOTA:** Imagens de géis de agarose 1% mostrando os produtos de amplificação. A identificação das amostras aparece acima do gel, sendo que WT é o parasito tipo selvagem e ao lado estão quatro clones selecionados para as avaliações. O esquema representando a integração do cassete no genoma e o tamanho esperado para cada amplificação também estão representados nas imagens.

**21.1)** Produto de amplificação de PCR utilizando *primers* 394\_For e Neo 5'out, que anelam em uma região do genoma (início da sequência codificadora de  $\beta 2$ -amastina) e do cassete, respectivamente; **21.2)** Imagem de gel contendo o *amplicon* gerado após PCR com os iniciadores 32UpCon, que anela em um gene que está à montante de  $\beta 2$ -amastina e HX1 5'out que anela no cassete. O *amplicon* tem o tamanho esperado.

Após confirmação da integração deste primeiro cassete foi iniciada a avaliação de possíveis alterações de fenótipo nos parasitos. Como as  $\beta$ -amastinas são mais expressas por formas epimastigotas, o acompanhamento da taxa de crescimento e diferenciação dos parasitos mutantes em comparação com o tipo selvagem são análises pertinentes.

Primeiramente, por meio de contagem (como descrito no item 5.25) foi avaliada a taxa de crescimento em meio LIT de epimastigotas selvagens e transfectadas. A análise da triplicata dessa curva de crescimento (FIGURA 22) mostrou não haver diferenças significativas entre parasitos selvagens e nos clones mutantes heterozigotos.



**FIGURA 22. Avaliação do efeito da deleção de  $\beta$ -amastinas em um dos alelos de CL Brener**

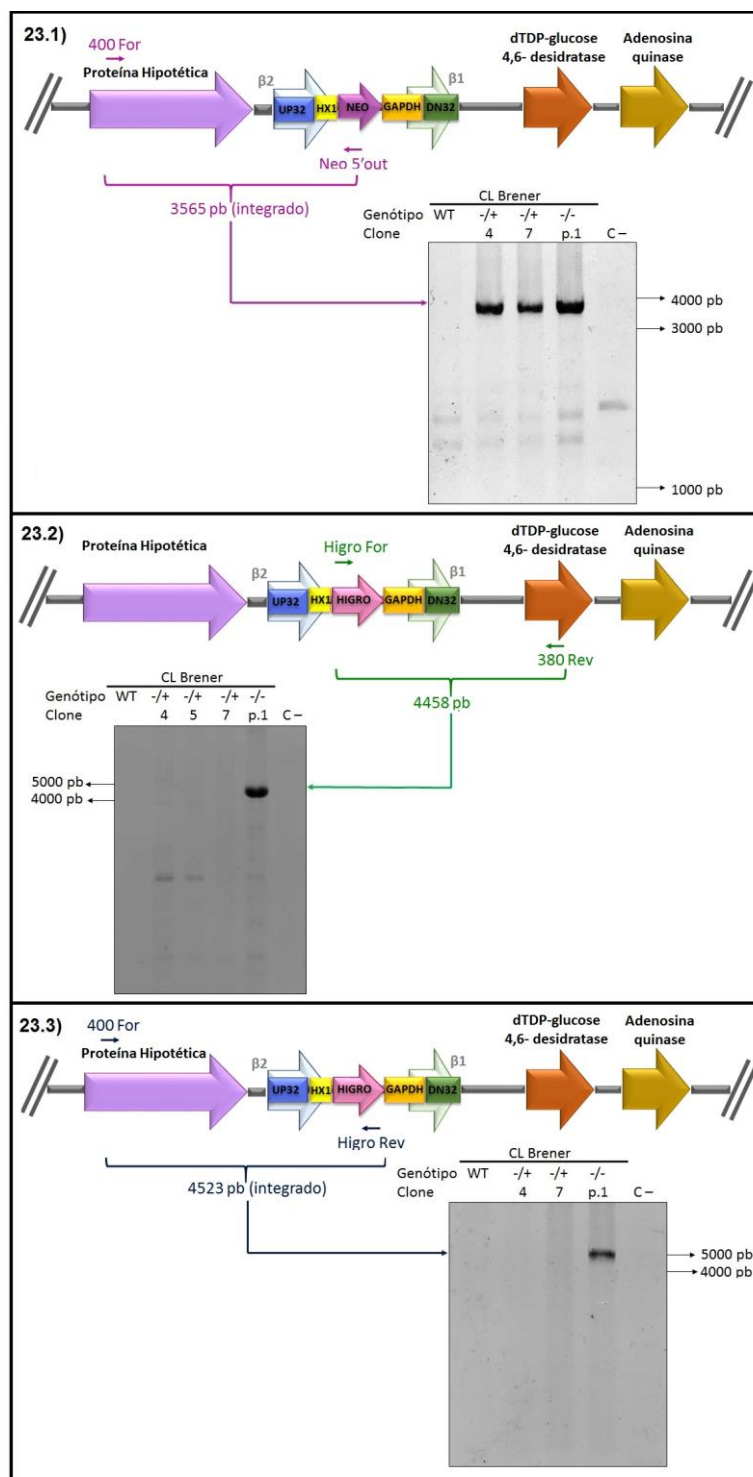
**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA:** A identificação de cada amostra aparece à direita, sendo WT referente a parasitos tipo selvagem e abaixo os três clones mutantes heterozigotos mutantes (+/-) avaliados. O número de parasitos é representado no eixo Y e o tempo de contagem no eixo X. A triplicata de contagens iniciou com inóculos de  $0,5 \times 10^6$  parasitos/mL e o crescimento foi acompanhado diariamente por contagem em câmara de Neubauer. A plotagem do gráfico foi realizada pelo programa GraphPad Prism 6.

Paralelamente às avaliações de fenótipo, foi realizada a transfecção do segundo cassete de deleção, cuja única diferença em relação ao primeiro é que a sequência de resistência a G418 foi substituída pelo gene de Higromicina B fosfotransferase que confere resistência ao antibiótico Higromicina B. Após três tentativas malsucedidas de seleção de parasitos resistentes aos dois antibióticos (G418 e Higromicina), num último intento de geração de parasitos nocaute (-/-), foi possível completar a seleção com parasitos resistentes viáveis. Devido a obtenção tardia dessa população resistente, enquanto a clonagem desses parasitos estava em andamento foram realizados novos repiques e, cerca de 30 dias após finalização da seleção, foi realizada extração de DNA da população.

Com o intuito de diagnosticar a integração deste segundo cassete (e manutenção do primeiro), foram realizadas novas PCRs utilizando diferentes pares de iniciadores que anelam no cassete e em regiões a jusante e a montante do local de inserção desejado. Como pode ser visto na figura 23, foi confirmada a integração dos cassetes de deleção das  $\beta$ -amastinas no par homólogo do cromossomo 32.



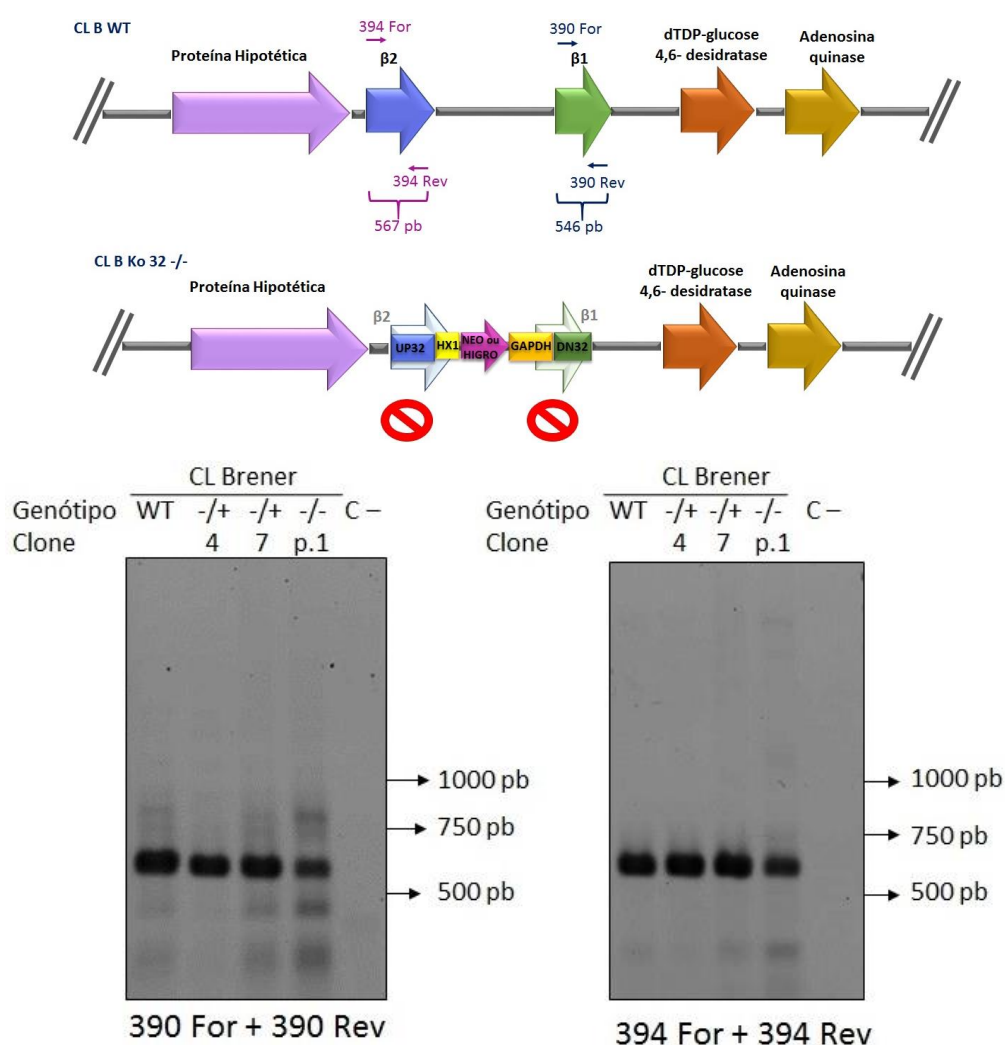


**FIGURA 23. Diagnóstico de entrada e integração do cassete UP32HIGRODN32 em CL Brener**  
**FONTE:** O autor (2016)

**NOTA:** Imagens de géis de agarose 1% mostrando os produtos de amplificação. A identificação das amostras aparece acima do gel, sendo WT referente a parasito tipo selvagem e ao lado os clones e população avaliados. O esquema representando a integração do cassete no genoma e o tamanho esperado para cada amplificação também estão representados nas imagens. **23.1)** Produto de amplificação de PCR utilizando *primers* 400\_For e Neo 5'out, que anelam em uma região do genoma a montante da sequência codificadora de  $\beta$ 2-amastina e dentro do cassete, respectivamente; **23.2)** Imagem de gel contendo o *amplicon* de cerca de 4460 pb, gerado por PCR com os iniciadores Higro\_For, que anela apenas no cassete UP32HigroDN32 e 380\_Rev, que anela no gene dTDP-glucose 4,6-desidratase, a jusante de  $\beta$ 1-amastina; **23.3)** Gel de outra PCR que confirmou a integração de UP32HigroDN32, agora com os *primers* 400\_For e Higro\_Rev.



Após confirmação da integração dos dois cassetes de deleção, foram realizadas outras amplificações por PCR, agora utilizando os *primers* que anelam na região codificadora de cada  $\beta$ -amastina. Considerando a integração dos dois cassetes de deleção no par homólogo do cromossomo 32 e a interrupção dos genes, o resultado esperado era que não houvesse amplificação de nenhuma das regiões codificadoras das  $\beta$ -amastinas, mas como pode ser visto na figura 24, para ambos os *primers* utilizados houve amplificação. A intensidade da banda é aparentemente mais fraca na população tomada até então como nocaute (avaliação qualitativa) quando comparado o perfil de amplificação de DNA de parasitos tipo selvagem (WT) e clones mutantes heterozigotos. Esse experimento foi realizado em triplicata e com diluições novas de reagentes.



**FIGURA 24. Amplificação de regiões codificadoras de  $\beta$ -amastinas em CL Brener**  
**FONTE:** O autor (2016)

**NOTA:** Os esquemas representam a região dos genes de  $\beta$ -amastinas e dos que os flanqueiam em parasitos tipo selvagem (WT) e o tamanho esperado de cada fragmento amplificado; e abaixo o esquema considerando a integração dos dois cassetes o genoma, sendo que não haveria anelamento de *primers* e amplificação de DNA de parasitos mutantes nocaute. Abaixo estão imagens de géis de agarose 1% mostrando os produtos de amplificação. A identificação das amostras aparece acima do gel, sendo que WT é o parasito tipo selvagem e ao lado estão clones e a população avaliados.

A dificuldade em obtenção de nocaute de genes em tripanossomatídeos já foi relatada em vários estudos (CRUZ *et al.*, 1993; SERPELONI *et al.*, 2011). Além disso, com intuito de interferir na expressão de *tryA* (tripanotiona redutase) utilizando RNA-*antisense* em *T. cruzi*, os pesquisadores Jorge Tovar e Alan Fairlamb relataram que mesmo aumentando a pressão de seleção para este RNA complementar não foram observaram alterações fenotípicas quando comparado com parasitos controle. Dando continuidade às análises, verificaram que houve rearranjo na sequência antisense do plasmídeo, levando a sua organização em orientação *sense*, o que de fato não causou perturbação na expressão do gene de interesse (TOVAR e FAIRLAMB, 1996).

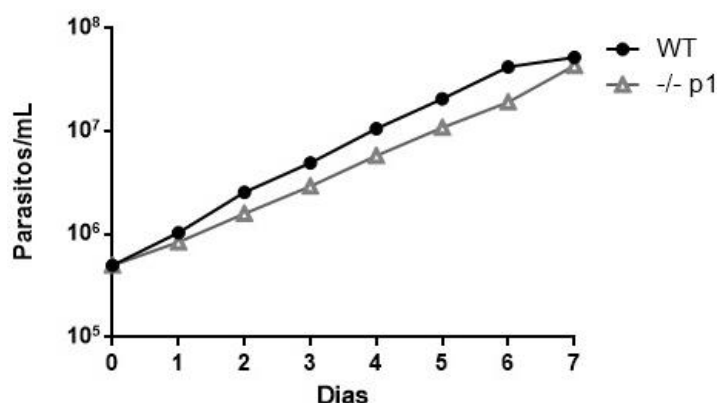
Em trabalho pioneiro de tentativa de nocautear genes em *Leishmania*, Dra Angela Cruz e colaboradores procuravam possíveis efeitos da deleção do gene *dhfr-ts* (diidrofolato redutase timidilato sintase) em linhagens de *Leishmania major*, verificaram que mesmo após a integração de construções para deleção ainda era possível localizar a região codificadora de *dhfr-ts* no genoma. Concluíram que ocorreu aneuploidia nos parasitos mutantes, que ao invés de diploides para este gene, sofreram amplificação gênica tornando-se tetraploides para o *locus*, sugerindo que esse gene é essencial (CRUZ *et al.*, 1993). Também com intuito de deletar por recombinação homóloga o gene *dhfr-ts*, mas nesse caso em *T. cruzi*, outro grupo conseguiu apenas parasitos mutantes heterozigotos (sendo possível verificar prejuízo no crescimento de epimastigotas), pois mesmo após selecionar parasitos duplo-resistentes ainda foi possível verificar a retenção de uma cópia desse gene, outro indício de que ele é essencial e os parasitos procuraram evitar esta perda (BRANDAN *et al.*, 2011).

Semelhante ao descrito aqui, Serpeloni e colaboradores tentaram interromper a expressão de Sub2 em *T. cruzi*, contudo obtiveram apenas parasitos nocaute simples para esse gene, pois ao realizarem transfecções para integração do segundo cassete não foi possível selecionar parasitos duplo-resistentes viáveis. Mesmo sendo um gene essencial os parasitos mutantes heterozigotos não exibiram alterações fenotípicas (SERPELONI *et al.*, 2011).

Já quando o interesse era bloquear em *T. cruzi* a expressão de *MSH2* (que participa da reparação de DNA mal pareados) a partir de cassetes construídos para integrar e deletar este gene no par homólogo de cromossomos, também só foi possível obter mutantes heterozigotos, sendo que em diferentes clones de CL Brener transfectados houve a integração do cassete em um dos alelos e essa deleção não causou alterações na taxa de crescimento de epimastigotas, sendo apenas verificada diminuição de tolerância quando analisado o crescimento em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CAMPOS *et al.*, 2011). E em 2015, a partir de parasitos nocaute simples gerados no estudo anterior (que tiveram *msh2* interrompido pelo gene de resistência a higromicina) foi realizada transfecção de cassete (com conteúdo diferente dos anteriores, desta vez utilizando a região codificadora ao invés da 3' UTR) para

deleção do segundo alelo, sendo desta vez obtido sucesso para nocaute duplo do gene e possível também a complementação da expressão desse gene deletado, o que possibilitou a reversão do fenótipo do nocaute, que havia sido de aumento da resistência a  $H_2O_2$  (GRAZIELLE-SILVA *et al.*, 2015). Este trabalho é importante para ressaltar que talvez a tentativa de deleção deve ser repensada.

Embora a ausência de alteração na taxa de crescimento de parasitos mutantes heterozigotos (FIGURA 22) e de duplo-resistentes (FIGURA 25) possa sugerir que a deleção de  $\beta$ -amastinas não altere fenótipo do parasito, não pode ser descartada a possibilidade de que estes genes sejam essenciais para *T. cruzi*, levando em conta a dificuldade na geração de parasitos duplo-resistentes e a observação de permanência dos genes que deveriam estar deletados.



**FIGURA 25. Avaliação do efeito da deleção de  $\beta$ -amastinas em parasitos transfectados duplo-resistentes CL Brener**

**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA:** A identificação de cada amostra aparece à direita, sendo WT referente a parasitos tipo selvagem e a população duplo resistente (-/-) avaliados. O número de parasitos é representado no eixo Y e o tempo de contagem no eixo X. As contagens deste experimento iniciaram com inóculos de  $0,5 \times 10^6$  parasitos/mL e o crescimento foi acompanhado diariamente por contagem em câmara de Neubauer. A plotagem do gráfico foi realizada pelo programa GraphPad Prism 6.

É essencial a realização de novas análises para verificar o que ocorreu de fato nesse caso. Como exemplos de ensaios de RFLP e *Southern blot* com amostras de DNA digerido dos parasitos selvagens, mutantes heterozigotos e duplo-resistentes seguido de hibridização com sondas específicas para cada gene de resistência e para as regiões codificadoras das  $\beta$ -amastinas. Além disso, experimentos de PCR quantitativa para avaliação do número de cópias destes genes (utilizando DNA dessas amostras), e também para verificar se há diferença nos níveis de expressão das  $\beta$ -amastinas (a partir de cDNA obtido por RT-PCR).

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foram identificados novos membros da família das amastinas em *Trypanosoma cruzi* (clone CL Brener), considerando as buscas em sequências que não foram possíveis de montar em cromossomos (provavelmente por estarem localizadas em região bastante repetitiva do genoma). Nesta análise, foram encontradas isoformas da subfamília  $\alpha$ -amastina, que ainda não haviam sido identificados em *T. cruzi*. Cabe ressaltar que à montante da primeira  $\alpha$ -amastina existe um segmento de GP63, uma glicoproteína de superfície codificada por uma família multigênica. Este fato deve ter dificultado a montagem em um grande *contig* ou cromossomo.

Tais sequências foram classificadas como  $\alpha$ 1-amastina e  $\alpha$ 2-amastina por apresentarem arranjo genômico semelhante as  $\alpha$ -amastinas de *Crithidia* sp e *Leishmania*, além de conterem maior similaridade de sequência e topologia com estas amastinas. Cada  $\alpha$ -amastina apresenta uma longa extensão hidrofílica na extremidade N-terminal, diferente do encontrado nas demais amastinas identificadas em *T. cruzi* até o momento. A conservação de aminoácidos que compõem a “assinatura das amastinas” está mantida nas  $\alpha$ -amastinas.

Sobre sua localização subcelular foi observado que essas proteínas, quando fusionadas a GFP apresentam localização perinuclear e dispersa na superfície (para  $\alpha$ 1-) e com padrão pontual no citoplasma para  $\alpha$ 2, sendo necessários experimentos adicionais visando chegar a co-localização com outras proteínas do parasito. Também é necessária a realização de separação de frações citoplasmática e de membrana do parasito; fracionamento de organelas e microscopia eletrônica para dar continuidade a localização dessas proteínas. É necessário também determinar o padrão de expressão das  $\alpha$ -amastinas em diferentes linhagens e formas biológicas de *T. cruzi*, a partir de experimentos de PCR quantitativa (qPCR).

Sobre a caracterização das  $\beta$ -amastinas por deleção por recombinação homóloga, até o momento foram obtidos parasitos mutantes heterozigotos e uma população duplo-resistente. As análises indicam que houve integração dos dois cassetes de deleção, porém como ainda foi observada a amplificação das regiões codificadoras de amastinas  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2- provavelmente ainda não foi obtido nocaute desses genes.

Buscando entender a razão para as regiões codificadoras de  $\beta$ -amastinas ainda estarem presentes nos parasitos cujos cassetes de deleção estão integrados é necessária a realização de diferentes experimentos, como restrição enzimática de DNA de parasitos selvagens e transfectados seguida de *Southern blot*, utilizando hibridização com sondas referentes aos genes de resistência a G418 e Higromicina e também sonda de cada  $\beta$ -amastina, o que poderá possibilitar a avaliação de intensidade dos sinais obtidos em cada

hibridização e sugerir se houve poliploidia da região de interesse. Quanto à análise de expressão das  $\beta$ -amastinas, como comentado na seção anterior, ensaios que podem contribuir são de PCR quantitativa e também de transcriptoma, para avaliar WT, mutantes heterozigotos e parasitos duplo-resistentes.

Caso seja comprovado que apenas um alelo de  $\beta$ -amastinas foi deletado, pode ser utilizada uma abordagem para nocaute de genes recentemente adaptada para *T. cruzi*: o sistema CRISPR-Cas9, que vem sendo utilizado com sucesso para deleção de genes, sendo eles cópia simples ou multicópias. Nesse sistema um RNA guia direciona a proteína Cas9 ao DNA alvo (que é seguido pelo motivo PAM: 5'-NGG-3'), onde ela vai induzir quebras de cadeia dupla (DSB) que são reparadas por micro-homologia "*microhomology-mediated end joining*" (MMEJ). CRISPR-Cas9 já foi utilizado com sucesso para interrupção da expressão de  $\alpha$ -tubulina e, em outro estudo, para deleção de genes que compõe o flagelo de *T. cruzi* (PENG *et al.*, 2014; LANDER *et al.*, 2015; BURLE-CALDAS *et al.*, 2015).

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA-SERRANO, A. *et al.* The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.114, n.2, p.143-150, 2001.
- ABUIN, G. *et al.* A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. **Molecular and Biochemical Parasitology.** v. 35, n. 3, p. 229–237, 1989.
- ALVES, M. J. and COLLI, W. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. **Sub-Cellular Biochemistry.** v. 47, p. 58–69, 2008.
- ANDREWS, N. W. *et al.* Stage-specific surface antigens during the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi*: developmentally regulated expression of a glycosyl-phosphatidylinositol anchored glycoprotein of amastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 83 (Suppl. 1), p. 561-562, 1988.
- ANGELOW, S. *et al.* Biology of claudins. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 295(4): p. 867-876, 2008.
- ANÔNIMO. Recommendations from a satellite meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 94, (Suppl. 1), p. 429-432, 1999.
- ARAÚJO, P. R. *et al.* Development of a dual reporter system to identify regulatory cis-acting elements in untranslated regions of *Trypanosoma cruzi* mRNAs. **Parasitol Int.** v. 60, p. 161-169, 2011.
- ASLETT *et al.* TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research.** v. 38 (Suppl. 1), p. 457-462; 2010.
- ATWOOD, J. A. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science.** v. 309, n. 5733, p. 473-476, 2005.
- ÁVILA, A. R. *et al.* Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Genetics Molecular Research.** v. 2, p.159-168, 2003.
- BALASEGARAM, M. *et al.* Neglected Diseases in the News: A Content Analysis of Recent International Media Coverage Focussing on Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 2 (Issue 5), p. 1- 5, 2008.
- BARRIAS, E. S. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. **Frontiers in immunology.** v. 4 n. 196, p. 1-10, 2013
- BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.** v. 181, p. 1333-1344, 2008.
- BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Res.** v. 37, p. 3407–3417, 2009.
- BERMUDEZ, J. *et al.* Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica.** v. 156 p. 1-16, 2016.

- BONTEMPI, E. *et al.* Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 33, p. 43-47, 1989.
- BRANCHE, C. *et al.* Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 147 p. 30-38, 2006.
- BRANDAN C. P. *et al.* Knockout of the dhfr-ts gene in *Trypanosoma cruzi* generates attenuated parasites able to confer protection against a virulent challenge. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 5 (Issue12), p. 1-10, 2011.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev Microbiol**. v. 27, p. 347-382, 1973.
- BURLE-CALDAS G. A, *et al.* Expanding the tool box for genetic manipulation of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**. v. 203, p. 25-33, 2015.
- BUSCAGLIA, C. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat. Rev. Microbiology**. v.4, n.3, p. 229-236, 2006.
- CAMPOS P. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. **Mol Biochem Parasitol**. v. 176 (Issue 1), p. 8-16, 2011.
- CAZZULO, J. J. *et al.* Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, n. 1, p. 33-41, 1989.
- CHAGAS, C. Nova Trypanozomíase Humana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. p. 160-218, 1909.
- CLAYTON, C.E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **Embo J**. v. 21, p. 1881-1888, 2002.
- CONTRERAS V. T. *et al.* Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 83, p. 123-133, 1988.
- COOPER, R. *et al.* Deletion of an immunodominant *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. **J Cell Biol**. v. 122, p. 149-156, 1993.
- COURA, J.R; ALBAJAR-VIÑAS, P. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**. 465 (Suppl.): S6-S7, 2010.
- CROOKS G. E., *et al.* WebLogo: A sequence logo generator, **Genome Research**. v. 14, p. 1188-1190, 2004.
- CROSS, G. A.; TAKLE, G. B. The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev. Microbiol**. v. 47, p. 385-411, 1993.
- CRUZ A. K, *et al.* Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 90, p. 1599-1603, 1993.
- CRUZ, M. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Role of d-Amastin on Extracellular Amastigote Cell Invasion and Differentiation. **PLoS ONE**. v. 7 (Issue 12), p. 1-11, 2012.

CUEVAS, I. C. *et al.* gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. **Infect Immun.** v. 71, p. 5739-5749, 2003.

DaROCHA, W. D. *et al.* Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol.** v. 133, p. 175-186, 2004a.

DaROCHA, W. D. *et al.* Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitol Res.** v. 92, p. 113-120, 2004b.

DE PAIVA, *et al.* Amastin knockdown in *Leishmania braziliensis* affects parasite-macrophage interaction and results in impaired viability of intracellular amastigotes. **PLoS Pathog.** v. 11 (Issue12), p. 1-24, 2015.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Phar Des.** v. 8, n. 4, p. 269-285, 2002.

DE SOUZA, W. *et al.* Electron microscopy and cytochemistry analysis os the endocitic pathway of pathogenic protozoa. **Prog Histochem Cytochem** v. 44, n.2, p. 67-124, 2009.

DOCAMPO, R. *et al.* Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. **Nat Rev Microbiol.** v. 3 n. 3, p. 254-261, 2005.

DOCAMPO, R. *et al.* New insights into roles of acidocalcisomes and contractile vacuole complex in osmoregulation in protists. **Int Rev Cell Mol Biol.** v. 305, p. 69-113, 2013.

DOS SANTOS, S. L. *et al.* The MASP Family of *Trypanosoma cruzi*: Changes in Gene Expression and Antigenic Profile during the Acute Phase of Experimental Infection. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 6 (Issue 8) p. 1-14, 2012.

EL-SAYED, N. M. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science.** v. 309, p. 409-415, 2005a.

EL-SAYED, N. M. *et al.* Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science.** v. 309, p. 404-409, 2005b.

ENGMAN, D. N. *et al.* *Trypanosoma cruzi* exhibits inter- and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. **Mol Biochem Parasitol.** v. 22, p. 115-123, 1987.

EPTING, C. L. *et al.* Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **ExpParasitol.** v. 126, p. 283-291, 2010.

FRANZÉN, O. *et al.* Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 5 (Issue 3), p. 1-9, 2011.

FREITAS, L. M. *et al.* Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. **PLoS ONE.** v. 6 (Issue10), p. 1-14, 2011.

FURUSE, M. *et al.* Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. **J. Cell Biol.** v. 141, p. 1539–1550, 1998.



GHEDIN, E. *et al.* Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 134, p. 183-191, 2004.

Giordano, R. *et al.* Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin," **Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n. 6, p. 3461–3468, 1999.

GRAZIELLE-SILVA V. *et al.* Distinct Phenotypes Caused by Mutation of MSH2 in Trypanosome Insect and Mammalian Life Cycle Forms Are Associated with Parasite Adaptation to Oxidative Stress. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 9 (Issue 6), p. 1-27, 2015.

GRISARD E. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c draft genome sequence. **Genome Announc**. v. 2 (Issue 1), p. 1-2, 2014.

GOUY, M., *et al.* SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**. v. 27 (Issue 2), p. 221-224, 2010.

HIROKAWA T. *et al.* SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. **Bioinformatics**. v. 14, p. 378-379, 1998.

IVENS, A. C. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**. v. 309, p. 436-442, 2005.

JACKSON, A. P. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. **Mol Biol Evol**, v. 27, p. 33-45, 2010.

KAHN, S. *et al.* The major 85-kDa surface antigen of the mammalian-stage forms of *Trypanosoma cruzi* is a family of sialidases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. v. 88, p. 4481-4485, 1991.

KAHN, S. *et al.* The major 85-kD surface antigen of the mammalian form of *Trypanosoma cruzi* is encoded by a large heterogeneous family of simultaneously expressed genes. **J ExpMed**. v. 172, p. 589-597, 1990.

KANGUSSU-MARCOLINO, M. *et al.* Distinct genomic organization, mRNA expression and cellular localization of members of two amastin sub-families present in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**. v.13, p. 1-11, 2013.

KAWASHITA, S. Y. *et al.* Homology, paralogy and function of DGF-1, a highly dispersed *Trypanosoma cruzi* specific gene family and its implications for information entropy of its encoded proteins. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 165, p. 19-31, 2009.

KELLEY, L. A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**. v. 10, p.845-858, 2015.

KIBBE, W. A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. **Nucleic Acids Res**. 35 (webserver issue), 2007. Disponível em  
<<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>>

KOLEV, N. G. *et al.* The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. **PLoS Pathog**, v. 6 (Issue 9), p. 1-15, 2010.

KULKARNI, M. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* GP63 Proteins Undergo Stage-Specific Differential Posttranslational Modification and Are Important for Host Cell Infection. ***Infection and Immunity***. v.77, p. 2193-2000, 2009.

LANDER, N. *et al.* CRISPR/Cas9-Induced disruption of paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* reveals their role in flagellar attachment. ***mBio***. v. 6 (Issue 4), p. 1-12, 2015.

LANDY A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. ***Ann. Rev. Biochem.*** v. 58, p. 913-949, 1989.

LARANJA F. S. *et al.* Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. ***Circulation***. v. 14, p. 1035–1060, 1956

LETUNIC I., *et al.* SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. ***Nucleic Acids Res.*** v. 40, p. 1-4, 2012.

LOW, H. P.; TARLETON, R. L. Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein and its identification as a member of the *Trypanosoma cruzi* sialidase superfamily. ***Mol Biochem Parasitol***. v. 88, p. 137-149, 1997.

LYE, L. F. *et al.* Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. ***PLoS Pathog.*** v. 6 (Issue 10), p. 1-13, 2010.

MACRAE, J. I.; OBADO, S. O.; TURNOCK, D. C. *et al.* The suppression of galactose metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes causes changes in cell surface molecular architecture and cell morphology. ***Mol Biochem Parasitol***, v.147, p. 126-136, 2006.

MAGANTO-GARCIA, E. *et al.* Rab5 activation by Toll-like receptor 2 is required for *Trypanosoma cruzi* internalization and replication in macrophages. ***Traffic***. v. 9, p. 1299–1315, 2008.

MAGDESIAN, M. N. "Infection by *Trypanosoma cruzi*: identification of a parasite ligand and its host cell receptor," ***Journal of Biological Chemistry***. v. 276, n. 22, p. 19382–19389, 2001.

MARTINEZ-CALVILLO, S. *et al.* Gene expression in trypanosomatid parasites. ***J Biomed Biotechnol***, v. 2010, p. 1-15, 2010.

MYLER, P. J. *et al.* Leishmania major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U S A***, v. 96, p. 2902-2906, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Governo Federal. Doença de Chagas**. Disponível em < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doenca-de-chagas>>, último acesso em 08 de março de 2016.

MORRIS, J. C *et al.* Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. ***Int J Parasitol***. v. 31, p. 453-458, 2001

NCBI (National Center for Biotechnology Information). **tBlastn**. Disponível em < [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)> último acesso em 08 de fevereiro de 2016.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). **ORF Finder**. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>> último acesso em 16 de fevereiro de 2016.

NILSSON, D. *et al.* Spliced leader trapping reveals widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*. **PLoS Pathog**, v. 6 (Issue 8) p. 1-13, 2010.

NGÔ, H. *et al.* Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. v. 95, p. 14687–14692, 1998.

NOGUEIRA, R. T. *et al.* Biological and immunological characterization of recombinant Yellow Fever 17D Viruses expressing a *Trypanosoma cruzi* Amastigote Surface Protein-2 CD8+ T cell epitope at two distinct regions of the genome. **Virolog J**. v. 8, p. 127, 2011.

NUNES, M. C. *et al.* Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am Coll Cardiol**. v. 62, p. 767-776, 2013.

OKUDA K., *et al.* The cytostome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is associated with the flagellar complex. **Exp Parasitol**. v. 92, p.223–231, 1999.

OLIVAS-RUBIO, M. *et al.* cDNA cloning and partial characterization of amastigote specific surface protein from *Trypanosoma cruzi*. **Infect Genet Evol**. v. 9, p. 1083-1091, 2009.

OMASITS U. *et al.* Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. **Bioinformatics**. v. 30, n. 63, p. 884-886, 2014.

PAHO, Pan American Health Organization. Chagas disease (American Trypanosomiasis). Disponível em [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743), último acesso em 08 de março de 2016.

PENG, D. *et al.* CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in *Trypanosoma cruzi*. **mBio**. v. 6 (Issue 1) p. 1-11, 2014.

PÉREZ-MOLINA, J. A. *et al.* Chagas Disease in Non-Endemic Countries: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. **Curr Infect Dis Rep**. v. 14, p. 263–274, 2012.

POSTAN, M. *et al.* Studies of *Trypanosoma cruzi* Clones in Inbred Mice: I. A Comparison of the Course of Infection of C3H/HEN<sup>-</sup> mice with two clones isolated from a common source. **Am J Trop Med Hyg**. v. 32, p. 497-506, 1983.

POWELL, W.D. Barrier function of epithelia. **Am J Physiol**. v. 241, p. 275-288, 1981.

RASSI, A. *et al.* Chagas disease. **Lancet**. v. 375 n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

RAYMOND, F. *et al.* Genomic sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**. v. 40, n. 3, p. 1131–1147, 2011.

REQUENA, J. M. *et al.* Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology today**. v.12, p. 279-282, 1996.

ROBINSON, D. R.; GULL, K. Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. **Nature**. v. 352 p. 731-734, 1991.

ROCHETTE, A. *et al.* Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. **Mol Biochem Parasitol**. v. 140, p. 205-220, 2005.

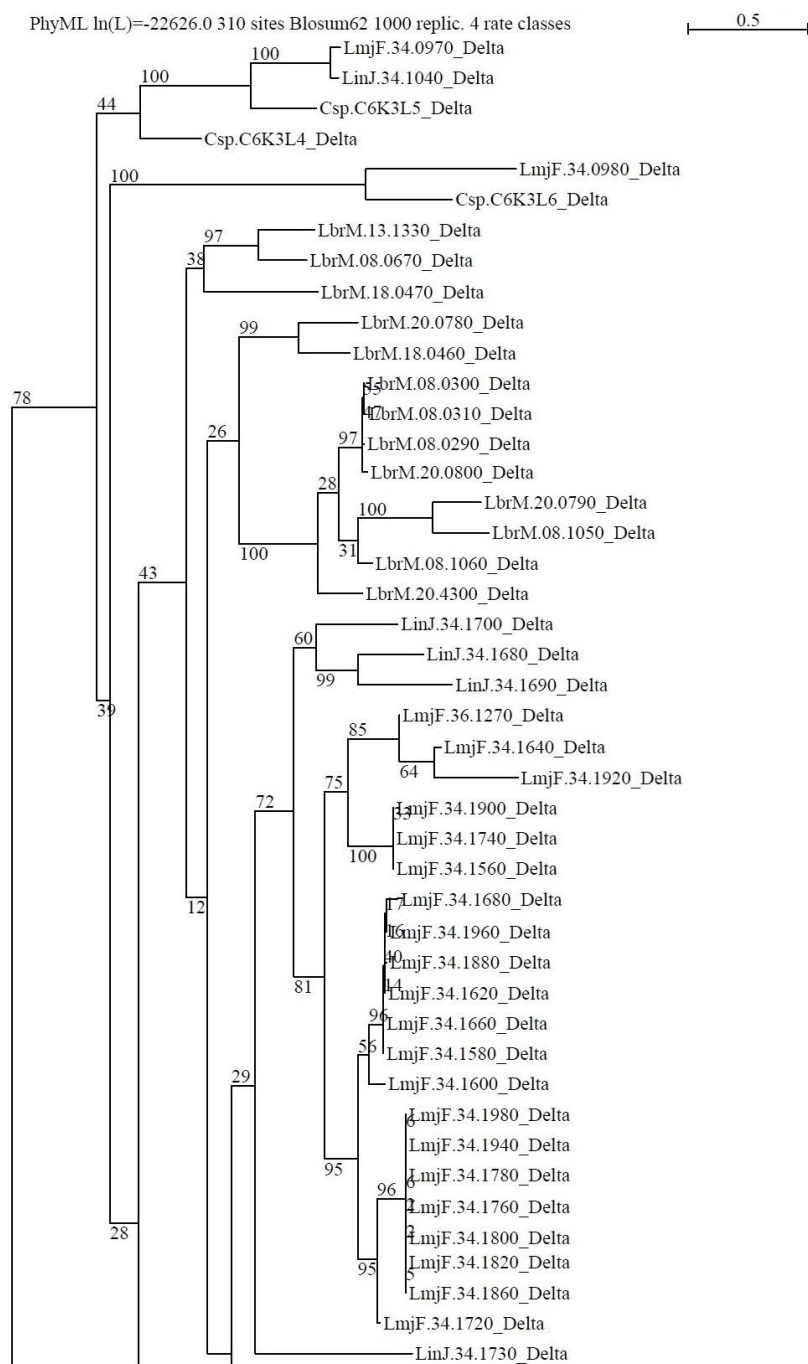
- RUIZ, R. C. *et al.* Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential  $\text{Ca}^{2+}$  signalling activity. **Biochemical Journal**. v. 330, n. 1, p. 505–511, 1998.
- SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SANTOS, M. A.; GARG, N.; TARLETON, R. L. The identification and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* amastigote surface protein-1, a member of the trans-sialidase gene super-family. **MolBiochemParasitol**, v. 86, p. 1-11, 1997.
- SCHENKMAN, S. *et al.* Structural and functional properties of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Annu Rev Microbiol**, v. 48, p. 499-523, 1994.
- SCHMUNIS G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 102 (Suppl. I), p. 75-85, 2007.
- SCHNEEBERGER, E. E.; LYNCH, R. D. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. **Am J Physiol**. v. 262, n. 6, p. 647-661, 1992.
- SHER, A.; SNARY, D. Specific inhibition of the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* by a monoclonal antibody. **Nature**. v. 300, p. 639-640, 1982.
- SHI H., *et al.* Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. **RNA**. v. 6, p. 1069-1076, 2000.
- SIBLEY, L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunol Rev**. v. 240, p. 72-91, 2011.
- SIEGEL, T. N. *et al.* Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. **Nucleic Acids Res**. v. 38, p. 4946-4957, 2010.
- SIEVERS, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**. v. 7. n. 539, p. 1-6, 2011.
- SOLARI, A. J. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. **Chromosoma**. v. 78, p. 239-55, 1980.
- SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J Mol Biol**. v. 98, p. 503-517, 1975.
- SOUTO-PADRON, T. *et al.* Quick-freeze, deep-etch rotary replication of *Trypanosoma cruzi* and *Herpetomonas megaseliae*. **J. Cell Sci**. v. 69, p. 167-178, 1984.
- SOUTO-PADRÓN, T. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. **Journal of Cell Science**, v. 96, n. 3, p. 485–490, 1990.
- SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes, a historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 103, p. 313-325, 2008.
- STOBER, C. B. *et al.* From genome to vaccines for leishmaniasis: screening 100 novel vaccine candidates against murine *Leishmania major* infection. **Vaccine**. v. 24, p. 2602-2616, 2006.

- STURM, N. R.; Simpson, L. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. **Cell**. v. 61, p. 879–884, 1990.
- SUZUKI, H. *et al.* Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. **Science**. v. 344, p. 604-306, 2014.
- TARDIEUX, I. *et al.* Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**. v. 71, p. 1117–1130, 1992.
- TEIXEIRA, S. M. *et al.* A differentially expressed gene family encoding "amastin," a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **J Biol Chem**. v. 269, p. 20509-20516, 1994.
- TEIXEIRA, S. M. *et al.* Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**. v. 270, p. 22586-22594, 1995.
- TEIXEIRA, S. M. *et al.* Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genetics and Molecular Biology**. v. 35, p. 1-17, 2012.
- TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International Journal for Parasitology**. v. 28, p. 85-104, 1998.
- TOVAR J., FAIRLAMB A. H. Extrachromosomal, homologous expression of trypanothione reductase and its complementary mRNA in *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Res**. v. 24 n. 15, p. 2942-2949, 1996.
- TYLER, K. M. *et al.* The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int J Parasitol**. v. 31, p. 472-481, 2001.
- VASCONCELOS, J. R. *et al.* Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. **Hum Gene Ther**. v. 15, p. 878-886, 2004.
- VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2b gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. **Gene**. v. 239, p. 217–225, 1999.
- WEATHERLY, D. B. *et al.*, Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. **BMC Genomics**. v. 10, n. 255, 2009.
- WHO, Chagas Disease (American trypanosomiasis) factsheet nº 340. Atualizado em março de 2016. Disponível em < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> último acesso em 08 de março de 2016.
- WU, Y. *et al.* A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 110 p. 345-357, 2000.
- YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, n. 1, p. 101–107, 2009.
- ZINGALES, B. *et al.* *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. **Acta Tropica**. v. 68, p. 159-173, 1997.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 104, p. 1051-1054, 2009.

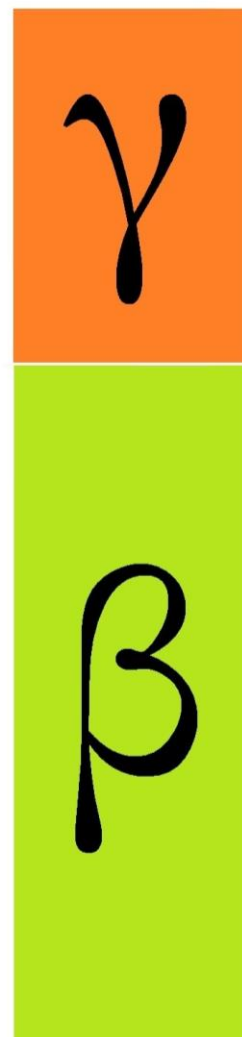
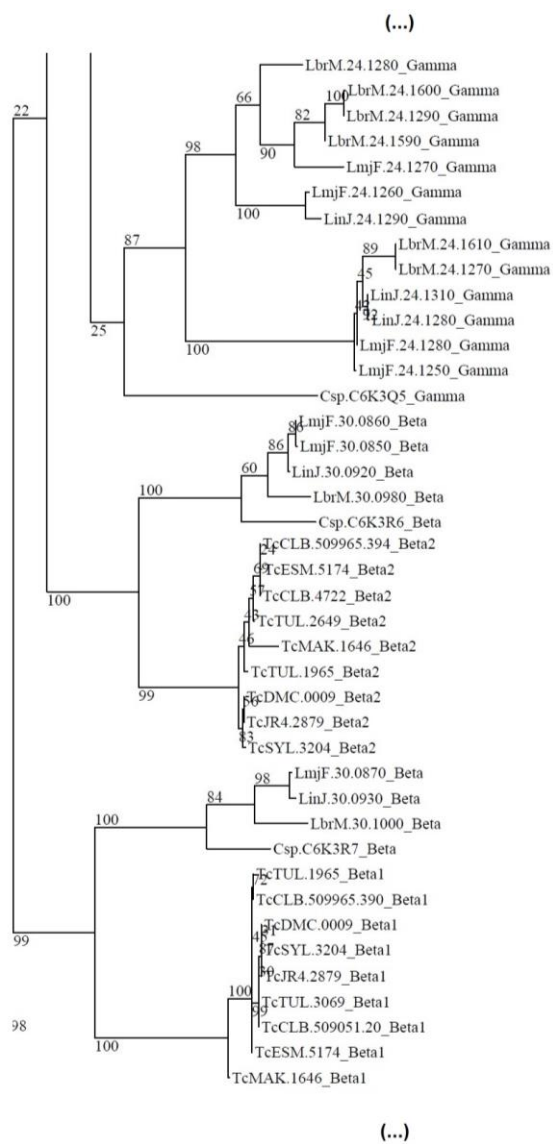
ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? **Revista da Biologia**. v. 6b, p. 44-48, 2011.

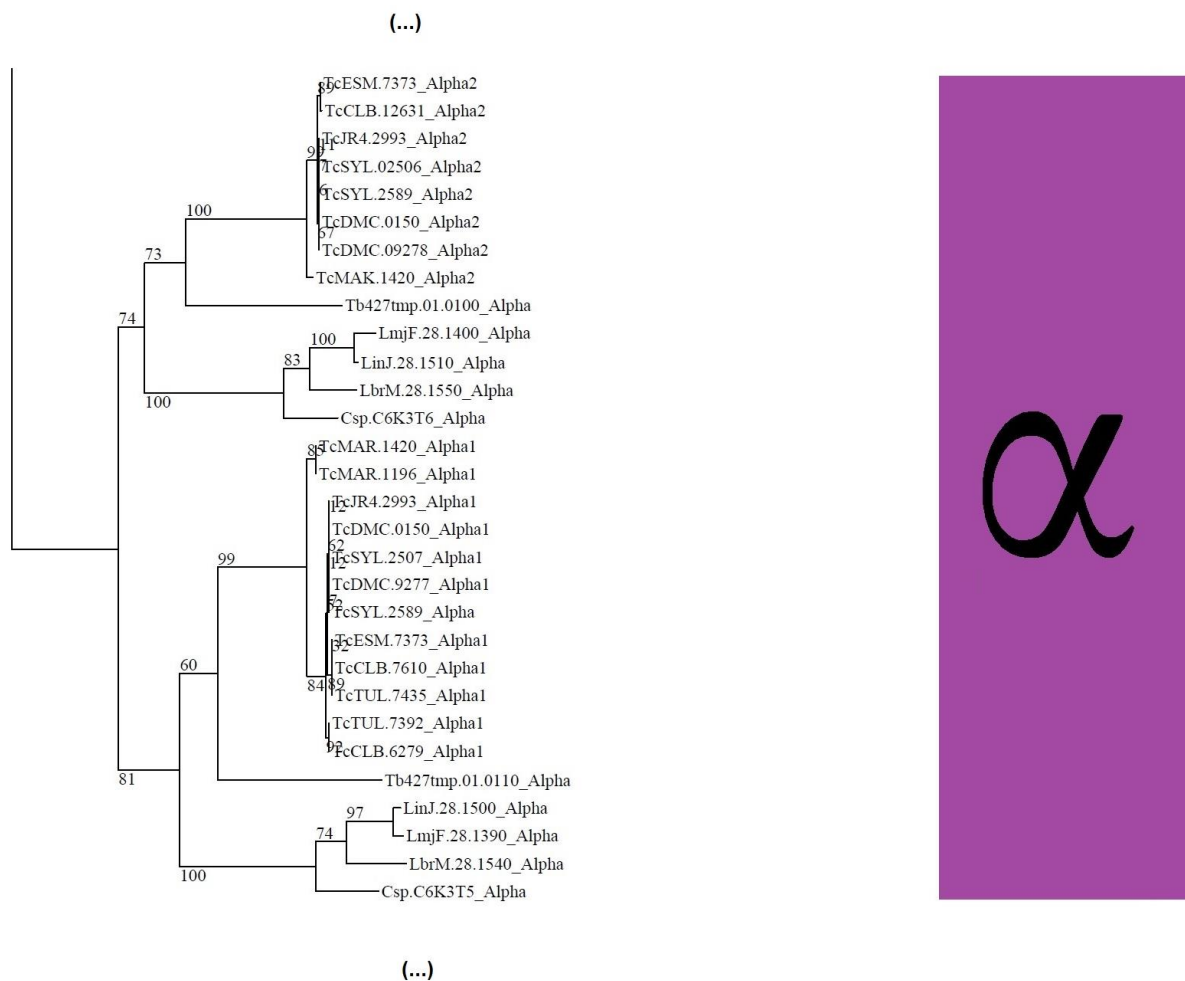
(...)











#### ANEXO 1. Figura 8 ampliada.

**FONTE:** O autor (2016).

**NOTA:** A partir do alinhamento originado pelo programa Clustal Omega e que gerou um arquivo multifasta, foi realizada análise filogenética pelo programa Seaview4, que agrupou as amastinas identificadas em *T. cruzi* (em diferentes cepas e clones), *T. brucei*, *Leishmania major*, *L. brasiliensis*, *L. infantum* e *Crithidia* sp de forma semelhante a verificada na literatura. O *bootstrap* utilizado na análise foi 1000. Para melhor visualização a figura original foi dividida em quatro partes, sendo que duas contêm as amastinas classificadas como delta, a terceira figura mostra amastinas classificadas como gama e beta e na última imagem estão as alfa-amastinas de diferentes tripanossomatídeos.